

明細書

- セラミド輸送を促進する薬剤、該薬剤を製造する塩基配列、セラミド遊
5 離を促進する活性の測定方法、及びセラミドの膜間移動を促進する活性
の測定方法

技術分野

- 本発明は、セラミド輸送を促進する薬剤、該薬剤を製造する塩基配列、
10 セラミド遊離を促進する活性の測定方法、及びセラミドの膜間移動を促
進する活性の測定方法に関するものである。

背景技術

- スフィンゴ脂質は、真核生物に普遍的に存在する脂質である。スフィ
15 ンゴ脂質は、細胞増殖・分化、炎症反応、及び細胞死といった様々な細
胞機能だけでなく、宿主細胞への病原体感染や毒素進入などに重要な役
割をはたしている。よって、その代謝や局在に影響を与えるタンパク質
や化学物質の発見・発明が望まれている。

- 20 セラミドは、スフィンゴ脂質合成の中間体として生合成される分子で
あり、また、複合スフィンゴ脂質の分解によっても生じる分子である。
生体内セラミドは、複合脂質合成中間体としての役割だけでなく、細胞
増殖や細胞死を制御する役割、および、皮膚組織の保水性維持を司る役
割の点から特に注目されている。セラミドは、疎水性が大変高く水に全
25 く溶けず、それ単独では膜間移動速度が極めて遅い。そこで、従来、セ
ラミドを細胞に与える場合、非特許文献1～3に記載されるように短い

アシル鎖にして親水性を上げた短鎖セラミドを代替利用したり、また、非特許文献 4 に記載されるようにエタノール・ドデカン混液に溶かした天然型セラミドを供することが行われてきた。しかしながら、前者の方法では短鎖セラミドが天然型セラミドの機能を不完全にしか模倣しないことが、一方、後者の方法では有機溶媒の毒性が、それぞれ大きな問題となる。これらの問題を解決するには、天然型セラミドの膜間移動を選択的に触媒するような親水性分子の利用によりセラミドを細胞に与える方法が考えられる。しかし、そのような親水性分子は発見・発明されていなかった。

10

細胞内では、小胞体で生合成されたセラミドは効率よくゴルジ体へと移動してスフィンゴミエリン(SM)へと変換している。しかし、セラミドの膜間輸送にどのような特異的分子が関わっているかは不明であった。

15

また、最近、一酸化窒素で誘導されるグリオーマ細胞の細胞死において、細胞内セラミド輸送の阻害が起こることが示されている。よって、セラミド輸送に特異的に関わる生体分子は、例えば、セラミド輸送を促進する生体分子は、細胞の生死を制御する新規な薬剤としても期待されるが、上述したようにセラミド輸送に関わる生体分子は不明のままであった。

20

非特許文献 1 van Blitterswijk, W.J., van der Luit, A.H., Veldman, R.J., Verheij, M. and Borst, (J. Biochem. J. 369, 199-211., 2003)

非特許文献 2 Hannun, Y.A. and Luberto, C. (Trends Cell Biol. 10, 73-80., 2000)

25

非特許文献 3 Mathias, S., Pena, L.A. and Kolesnick, R.N. (Biochem. J. 335, 465-480., 1998)

非特許文献 4 Ji, L., Zhang, G., Uematsu, S., Akahori, Y. and Hirabayashi, Y. (FEBS Lett. 358, 211-214., 1995)

従って、本発明の目的は、セラミド輸送を促進する薬剤、該薬剤を製造する塩基配列、セラミド遊離を促進する活性の測定方法、及びセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法を提供することにある。

発明の開示

かかる実情において、本発明者らは鋭意検討を行った結果、細胞内セラミド輸送が欠損しているために SM 含有量が低下している動物培養細胞突然変異株(以下 LY-A 株とも述べる)を分離し、この変異株を用いた解析から、細胞内セラミド輸送には細胞質タンパク質が必須因子として関わっていることを明らかにし、SM 含有量の低下した細胞を選択的に死滅させる条件を発見し、かかる条件において LY-A 株の細胞の機能回復株、すなわち、細胞内セラミド輸送が回復するために SM 含有量が回復した機能回復株を選択する方法においてグッドパスチュア抗原結合タンパク質 (Goodpasture antigen-binding protein; 以下 GABP タンパク質と述べることもある) の別スプライシング型産物(以下 GPBP Δ 26 タンパク質と述べることもある)と本質的な配列が同質なタンパク質(以下 CERT タンパク質と述べることもある) が含有されている場合に機能回復株が得られることを知見し、細胞内セラミド輸送の促進に該 CERT タンパク質を有効成分として含有する薬剤が有効であることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明(1)は、配列番号1のアミノ酸配列を有する hCERT タンパク質、配列番号2のアミノ酸配列を有する hCERT_L タンパク質、配

列番号 3 のアミノ酸配列を有する cCERT タンパク質、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する cCERT_L タンパク質、又はそれらの組換えタンパク質を有効成分として含有するセラミド輸送を促進する薬剤を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明（1）は、セラミド輸送を促進する新規な薬剤を提供することができるという効果を奏する。

また、本発明（2）は、制ガン剤、抗炎症剤、器官再生剤、抗感染症剤、又は化粧品用の分配促進剤として用いられる薬剤である前記発明（1）に記載される薬剤を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明（2）は、前記発明（1）が奏する効果に加えて、新規な制ガン剤、抗炎症剤、器官再生剤、抗感染症剤、又は化粧品用の分配促進剤を提供することができるという効果を奏する。

また、本発明（3）はセラミド輸送を阻害する薬剤の検出に用いられる前記（1）に記載される薬剤を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明（3）は、前記発明（1）が奏する効果に加えて、新規な薬剤の開発方法を提供することができるという効果を奏する。

また、本発明（4）は、配列番号 1 または 3 のアミノ酸配列の第 370 残基～第 598 残基、あるいは配列番号 2 又は 4 のアミノ酸配列の第 397 残基～第 624 残基からなる組換えタンパク質を有効成分とする前記発明（1）のセラミド輸送を促進する薬剤を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明（4）は、前記発明（1）が奏する効果に加えて、セラミド輸送を促進する活性が顕著に向上するという効果を奏する。

また、本発明（５）は、前記発明（１）に記載される薬剤を生産するために用いられる配列番号５，６，７または８の塩基配列、又はその組換え塩基配列を提供するものである。

5

また、本発明（６）は、配列番号５の塩基配列の第１１０８塩基対～第１７９４塩基対、配列番号６の塩基配列の第１１８９塩基対～第１８７２塩基対、配列番号７の塩基配列の第１５３９塩基対～第２２２５塩基対、又は配列番号８の塩基配列の第１１８９塩基対～第１８７２塩基対からなる組換え塩基配列であることを特徴とする前記発明（５）に記載の塩基配列を提供するものである。

10

また、本発明（７）は、セラミドを含有する脂質膜とセラミド遊離を促進する薬剤とを混合して得られた混合物を保温する保温工程を行い、遠心法で分離することにより保温した後の混合物から上清を得る分離工程を行い、次いで、得られた上清に含有されるセラミドを定量する定量工程を行うセラミド遊離を促進する活性の測定方法を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明（７）は、新規なセラミド遊離を促進する活性の測定方法を提供することができるという効果を奏する。

15

20

また、本発明（８）は、前記セラミドを含有する脂質膜が、ホスファチジルコリンとホスファチジリエタノールアミンの混合脂質にセラミドを添加して調製されたものである前記発明（７）に記載されるセラミド遊離を促進する活性の測定方法を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明（８）は、前記発明（７）が奏する効果に加

25

えて、セラミド遊離を促進する活性の測定を精度よく行うことができるという効果を奏する。

また、本発明（９）は、前記セラミドを含有する脂質膜が、超音波処
5 理されたものである前記発明（７）又は（８）に記載されるセラミド遊離を促進する活性の測定方法を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明（９）は、前記発明（７）又は（８）が奏する効果に加えて、セラミド遊離を促進する活性の測定を精度よく行うことができるという効果を奏する。

10

また、本発明（１０）は、前記セラミドを含有する脂質膜に添加されるセラミドが、放射性標識されたセラミドである前記発明（８）に記載されるセラミド遊離を促進する活性の測定方法を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明（１０）は、前記発明（８）
15 が奏する効果に加えて、定量工程におけるセラミドの定量を簡便に行うことができるという効果を奏する。

また、本発明（１１）は、受容膜とセラミド輸送を促進する薬剤とセラミドを含有する供与膜とを混合し、得られた混合物を保温する保温工
20 程を行い、保温工程で得られた混合物に選択的膜凝集剤を添加後、遠心法に供して受容膜と供与膜を分離する分離工程を行い、分離した受容膜及び供与膜がそれぞれ含有するセラミドを定量する定量工程を行うセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明（１１）は、新規なセラミドの膜
25 間移動を促進する活性の測定方法を提供することができるという効果を奏する。

また、本発明（１２）は、前記受容膜が、ホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンとの混合脂質で調製されたものである前記発明（１１）に記載されるセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明（１２）は、前記発明（１１）が奏する効果に加えて、セラミドの膜間移動を促進する活性の測定を精度よく行うことができるという効果を奏する。

10 また、本発明（１３）は、前記セラミドを含有する供与膜が、ホスファチジルコリンと、ホスファチジルエタノールと、ラクトシルセラミドと、セラミドとを含有する混合脂質から調製される前記発明（１１）又は（１２）に記載されるセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明（１
15 ３）は、前記発明（１１）又は（１２）が奏する効果に加えて、セラミドの膜間移動を促進する活性の測定を精度よく行うことができるという効果を奏する。

また、本発明（１４）は、前記セラミドを含有する供与膜に添加されるセラミドが、放射性標識されたセラミドである前記発明（１１）に記載されるセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明（１４）は、前記発明（１１）が奏する効果に加えて、定量工程におけるセラミドの定量を簡便に行うことができるという効果を奏する。

25

また、本発明（１５）は、前記選択的膜凝集剤がヒマ豆レクチンである前記発明（１１）～（１４）のいずれか一項に記載されるセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法を提供するものである。かかる構成を採用することにより、本発明（１５）は、前記発明（１１）～（１４）
5 が奏する効果に加えて、分離工程における分離を簡便且つ迅速に行うことができるという効果を奏する。

図面の簡単な説明

第１図は、CERT タンパク質のドメイン構造及びドメイン欠失構造を示す図である。第２図は、レトロウイルスベクターを用いて hCERT を導入した LY-A2 細胞の MCD およびライセニンに対する感受性を測定した結果を示す図である。第３図（Ａ）は、LY-A2/hCERT 細胞の MCD およびライセニンに対する反応性を示す図であり、第３図（Ｂ）は、CHO-K1 細胞、LY-A2 細胞、又は LY-A2/hCERT 細胞のリン脂質含有量を示す図である。第４図（Ａ）は、CHO-K1 細胞、LY-A2 細胞、又は LY-A2/hCERT 細胞における [^{14}C]セリンによる脂質代謝標識実験の結果を示す図であり、第４図（Ｂ）は、CHO-K1 細胞、LY-A2 細胞、又は LY-A2/hCERT 細胞における [^{14}C]コリンを用いた脂質代謝標識実験の結果を示す図である。第５図は、CHO-K1 細胞、LY-A2 細胞、又は LY-A2/hCERT 細胞における SM 合成酵素活性を示す図である。第６図は、CHO-K1 細胞、LY-A2 細胞、又は LY-A2/hCERT 細胞における $\text{C}_5\text{-DMB-Cer}$ を用いた細胞標識と蛍光顕微鏡観察の結果を示す図である。第７図は、CHO-K1 細胞、LY-A2 細胞、又は LY-A2/hCERT 細胞における $\text{C}_5\text{-DMB-Cer}$ の細胞内移動に及ぼすエネルギー阻害剤の影響を求めるために行われた
20 $\text{C}_5\text{-DMB-Cer}$ を用いた細胞標識と蛍光顕微鏡観察の結果を示す図である。第８図は、CHO-K1 細胞、LY-A2 細胞、又は LY-A2/hCERT
25

細胞における SM 新合成に及ぼす(1R, 3R)HPA-12 の影響を調べるために行われた放射性セリンを用いた脂質代謝標識実験の結果を示す図である。

第 9 図 (A) は、CHO-K1 細胞、LY-A 細胞、又は LY-A/hCERT 細胞の MCD 感受性を示す図であり、第 9 図 (B) は、CHO-K1 細胞、LY-A2 細胞、又は LY-A/hCERT 細胞における [^{14}C]セリンおよび [^{14}C]コリンを用いた脂質代謝標識実験の結果を示す図であり、第 9 図 (C) は、CHO-K1 細胞、LY-A2 細胞、又は LY-A/hCERT 細胞における $\text{C}_5\text{-DMB-Cer}$ を用いた細胞標識と蛍光顕微鏡観察の結果を示す図である。

第 10 図 (A) は、(LY-A2+FL-hCERT) 細胞、(LY-A2+FL-hCERT_L) 細胞、(LY-A2 + 空ベクター) 細胞、CHO-K1 細胞、及び LY-A2 細胞の MCD 感受性を示す図であり、第 10 図 (B) は、(LY-A2+FL-hCERT) 細胞、(LY-A2+FL-hCERT_L) 細胞、(LY-A2 + 空ベクター) 細胞の抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロット解析の結果を示す図である。

第 11 図は、CHO-K1 細胞、及び LY-A 細胞における CERT タンパク質をコードする mRNA のノザンブロット解析の結果を示す図である。

第 12 図 (A) は、CHO-K1 細胞、LY-A2 細胞、(LY-A2+cCERT(G67E)-FL) 細胞及び (LY-A2+cCERT-FL) 細胞の MCD 感受性を示す図であり、第 12 図 (B) は、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロット解析の結果を示す図である。

第 13 図 (A) は、(CHO-K1+ pEGFP) 細胞、(CHO-K1+ pcCERT-GFP) 細胞、(CHO-K1+ pcCERT(G67E)-GFP) 細胞に発現した GFP または GFP 融合 CERT とゴルジ体局在マーカーとの顕微鏡観察による局在解析の結果を示す図であり、第 13 図 (B) は、CHO-K1 細胞、(CHO-K1+ pEGFP) 細胞、(CHO-K1+ pcCERT-GFP) 細胞、(CHO-K1+ pcCERT(G67E)-GFP) 細胞を用いた抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロット解析の結果を示す図である。

第 14 図 (A) は、セラミドの遊離を促進する活性の hCERT タンパク質量への依存度を示す図であり、第 14 図 (B) は、セラミドの遊

離を促進する活性の時間依存性を示す図である。第 15 図は、セラミド、ジアシルグリセロール、コレステロール、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、スフィンゴシンの遊離を促進する活性の測定結果を示す図である。第 16 図は、hCERT タンパク質、hCERT_L タンパク質、

5 hCERT Δ PH タンパク質、hCERT Δ MR タンパク質、および hCERT Δ ST タンパク質、並びに PHhCERT タンパク質、MRhCERT タンパク質および SThCERT タンパク質によるセラミドの遊離活性の測定結果を示す図である。第 17 図 (A) は、セラミドの膜間移動を促進する活性の hCERT タンパク質量への依存度を示す図であり、第 17 図 (B) は、セラミドの膜間移動

10 を促進する活性の時間依存性を示す図であり、第 17 図 (C) は、セラミドの膜間移動を促進する活性の温度依存性を示す図である。第 18 図は、hCERT タンパク質、hCERT_L タンパク質、hCERT Δ PH タンパク質、hCERT Δ MR タンパク質、および hCERT Δ ST タンパク質、並びに PHhCERT タンパク質、MRhCERT タンパク質および SThCERT タンパク質によるセラ

15 ミドの膜間移動を促進する活性の測定結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の薬剤は、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する hCERT タンパク

20 質、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する hCERT_L タンパク質、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する cCERT タンパク質、または配列番号 4 のアミノ酸配列を有する cCERT_L タンパク質、又はそれらの組換えタンパク質を有効成分するものである。hCERT タンパク質及び cCERT タンパク質、並びに hCERT_L タンパク質及び cCERT_L タンパク質のドメイン構造及びこれら

25 のタンパク質のドメイン欠失構造を図 1 に示す。CERT タンパク質は、図 1 に示すように、アミノ末端約 120 アミノ酸領域にプレクストリンホ

モロジ- (PH) ドメインを、カルボキシル末端約 230 アミノ酸領域にステロイドジェック急性制御タンパク質関連脂質転移 (steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer; START) ドメインを、それらの中間領域 (middle region, MR) のドメインと大きく 3 つのドメインを持っていると考えられている。CERT タンパク質及び以下で述べる CERT_L タンパク質は、それぞれ哺乳動物間で 95 % 以上もの高いアミノ酸配列同一性を保持しており、それらタンパク質が持つ諸性質は哺乳動物全般で同質と考えられる。よって、ヒトもしくは CHO 細胞由来のもので具体的実施例を提示していてもこれらの種に限定されるものではない。

10 ここで、CERT タンパク質とは、ヒト細胞から得られた hCERT タンパク質及びハムスター細胞から得られた cCERT タンパク質並びにその他の哺乳動物の細胞から得られた類似のタンパク質を示し、CERT_L タンパク質とは、ヒト細胞から得られた hCERT_L タンパク質及びハムスター細胞から得られた cCERT_L タンパク質並びにその他の哺乳動物の細胞から得られた類似のタンパク質を示す。

15

ヒト CERT (hCERT) タンパク質は、次のようにして得ることができる。LY-A 株の SM 含量を回復させる相補的デオキシリボ核酸 (cDNA) を以下の手順に従って単離・同定する。ヒト培養細胞由来の cDNA ライブラリーを

20 レトロウイルスベクターを用いて高頻度かつ安定に LY-A 株に導入後、機能回復株を単離する。ここで用いた機能回復株選択法は、SM 含量の減少した細胞がコレステロール引き抜き試薬・メチルシクロデキストリン (MCD) に高感受性になり、SM 含量が回復した細胞が MCD に対する耐性を回復するという知見をもとにして行うことができる。ついで、単離した

25 機能回復株に導入されている cDNA をゲノミック・ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR) 法によって増幅して回収した。回収

- した cDNA は二次導入でも LY-A 株を野生株レベルの MCD 感受性へと変化させるものである。このようにして得られた配列番号 5 に記載される cDNA のコードするタンパク質は、ヒト GPBP Δ 26 (hGPBP Δ 26)として過去に発表されているタンパク質と同一であった。GPBP Δ 26 の細胞内での機能は未解決であった。本明細書に詳述するように、我々は、GPBP Δ 26 の細胞内での機能はセラミド輸送(ceramide trafficking)であることを発見したので、細胞内の機能を表した命名法とするために、GPBP Δ 26 と実質的に同一の配列を有するタンパク質を CERT タンパク質と命名した。また、GPBP と実質的に同一の配列を有するタンパク質を CERT_L(a large splicing variant of CERT)と命名した。単離・同定した cDNA を、例えば、大腸菌、酵母などの細菌、Sf9 細胞などの昆虫培養細胞、CHO 細胞、HeLa 細胞、HEK293 細胞などの哺乳動物培養細胞などで公知の方法によって発現させることにより、CERT タンパク質を得ることができる。
- 15 無細胞系においてヒト・コラーゲン 4 型のアルファ 3 鎖のカルボキシル末端配列に結合して、それをリン酸化するタンパク質として、ヒト GPBP (hGPBP)が報告されている。また、非特許文献 2 においては、hGPBP よりも 26 アミノ酸小さい別スプライシング型産物・hGPBP Δ 26 も存在していることが報告されている。転写 RNA レベルの解析から、hGPBP 及び
- 20 hGPBP Δ 26 はともに様々な器官で発現していることが示されているが、hGPBP Δ 26 のほうが優勢に発現していることが示されている。しかしながら、hGPBP Δ 26 および hGPBP は細胞質に主に局在しており、この局在は、細胞外分子であるコラーゲンを修飾するという最初に期待された機能とは矛盾している。よって、細胞内でのこれらタンパク質の生理的機能は過去の研究からは解明されていないと考えられるが、本発明者らによって、セラミド輸送を促進する薬剤として有効であることが示された。
- 25

また、CERT タンパク質の組換えタンパク質としては、N 末端のアミノ酸を第 1 残基として、START ドメイン、すなわち、配列番号 1 又は 3 の第 3 7 1 残基～第 5 9 8 残基あるいは配列番号 2 又は 4 の第 3 9 7 残基
5 ～第 6 2 4 残基を含有する断片を挙げることができ、このような断片は、*in vitro* 組換え DNA 法、合成法、および *in vivo* 組換え／遺伝子組換えにより得られた DNA 断片を発現させて得られた組換えタンパク質が挙げられる。このようなタンパク質として、PH ドメインを欠いた CERT Δ PH タンパク質、MR ドメインを欠いた CERT Δ MR タンパク質、START ドメインのみを有する ST CERT タンパク質などのドメイン欠失タンパク質を例示することができる。なお、CERT タンパク質の 3 7 0 番目のアミノ酸であるリシン残基は、MR ドメインのカルボキシル末端に相当すると予想される。しかし、カルボキシル末端のリシン残基によってタンパク質が不安定になる可能性があるので、ドメイン欠失タンパク質においては、
10 該リシン残基を START ドメインのアミノ末端に組み入て、MR ドメインから除いている。

さらに、hCERT タンパク質とアミノ酸塩基配列が本質的に同一である組換えタンパク質である hGABP Δ 26 タンパク質は、Raya, A らの方法 (J. Biol. Chem. 275, 40392-40399, 2000) により得られたプラスミドベクターを用いて、Raya, A らの方法 (J. Biol. Chem. 274, 12642-12649, 1999) に従って発現を行い、生成物を精製することにより得ることもできる。
20

hCERT_L タンパク質と本質的に同等な組換えタンパク質である hGPBP の cDNA の配列は公知の方法によって得ることができる (GenBank 番号 :
25

AF136450)。よって、不足している DNA 配列を PCR 法によって hCERT 配列に付加することで、hCERT_Lをコードする配列番号 6 の DNA 配列を得ることができる。そして、得た cDNA から調製したプラスミドベクターを用いて発現を行い、生成物を精製することで hCERT_Lタンパク質を得ることができる。また、当該 hCERT_Lタンパク質は、Raya, A らの方法(J. Biol. Chem. 274, 12642-12649, 1999)に従って、cDNA から調製したプラスミドベクターを用いて発現を行い、生成物を精製することにより得ることもできる。

さらに、配列番号 7 の塩基配列に対応する CHO 細胞由来の CERT (cCERT)の全長 cDNA 配列は、cDNA をクロンテック社 SMART RACE cDNA 増幅キットを用いて、cDNA 末端の迅速増幅(rapid amplification of cDNA ends; RACE)を行うことで決定することができる。そして、CHO 細胞 cDNA ライブラリーをテンプレートにした PCR を行うことで、cCERT の ORF を得ることができる。また、この PCR によって、配列番号 8 の塩基配列に対応する CHO 細胞由来の CERT_L(cCERT_L)をコードする DNA 配列を増幅し、クローニングすることもできる。cCERT_Lのアミノ酸配列は配列番号 4 に示している。

本発明の薬剤は、例えば、細胞死を促進または抑制させて、制ガン剤、抗炎症剤、器官再生剤、又は抗感染症剤として用いることができる。また、セラミドの分配促進剤として化粧品において用いることができる。さらに、セラミド輸送タンパク質の阻害剤探索のために利用することもできる。

25

- 本発明の薬剤は、注射、急速注入、鼻咽頭吸収、皮膚吸収により、非経口的に、および経口的に投与し得る。非経口投与のための製薬上許容可能な担体調製物としては、滅菌、あるいは水性または非水性の溶液、懸濁液および乳濁液が挙げられる。非水性溶媒の例は、プロピレングリ
- 5 コール、ポリエチレングリコール、植物油、例えばオリーブ油、注射可能有機エステル、例えばエチルオレエートである。閉塞性包帯用の担体は、皮膚透過性を増大し、抗原吸収を増強するために用い得る。経口投与のための液体投薬形態は一般に、液体投薬形態を含有するリポソーム溶液を包含し得る。リポソームを懸濁するための適切な形態としては、
- 10 当業界で一般に用いられる不活性希釈剤、例えば精製水を含有する乳濁液、懸濁液、溶液、シロップおよびエリキシルが挙げられる。不活性希釈剤の他に、このような組成物は、アジュバント、湿潤剤、乳化剤および沈殿防止剤、ならびに甘味剤、風味剤および香料も含有し得る。
- 15 本発明の薬剤は、アジュバントを含有することも可能である。アジュバントは、特異的免疫応答を非特異的に増大するために用い得る物質である。アジュバントは、それらの粗製に基づいて、大まかにいくつかの群に分けられる。
- 20 これらの群としては、油アジュバント（例えば、フロイントの完全および不完全アジュバント）、無機塩（例えば、 $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ 、 $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)$ 、シリカ、ミョウバン、 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、カオリンおよび炭素）、ポリヌクレオチド（例えばポリ IC およびポリ AU 酸）、ならびにある種の天然物質（例えば、結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* からのロウ D、な
- 25 らびに *Corynebacterium parvum*、百日咳菌 *Bordetella pertussis* およびブルセラ族の成員に見出される物質）が挙げられる。

発見者らは、セラミドを含む脂質膜を CERT タンパク質とともに保温後、遠心すると、脂質膜に残存するセラミドは沈降し、脂質膜から遊離したセラミドは上清に移行することを見出し、セラミドの遊離を促進する活性を測定する方法を発明した。以下に本発明のセラミド遊離を促進する活性の測定方法について以下に述べる。セラミドを含有する脂質膜としては、特に制限されないが、卵黄由来のホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンの混合脂質、または合成ホスファチジルコリンと合成ホスファチジルエタノールアミンの混合脂質にセラミドを添加して調製したものを例示することができる。このようにして得られたセラミドを含有する脂質膜は、窒素、アルゴンなどの不活性ガスを吹き付けること、または減圧乾燥によって乾固することができる。また、脂質膜又は乾固した脂質膜に NaCl および EDTA を添加したヘベス-NaOH 緩衝液、トリス塩酸緩衝液などの緩衝液を添加して浴槽型超音波発生器で超音波処理する方法などによって超音波処理することも可能である。超音波処理条件としては、例えば 20～25℃で行い、3～6 分間の超音波処理を行う条件を挙げることができる。

前記混合脂質に添加するセラミドとしては、放射性標識していないものでもよいが、測定の便宜を考えると、放射性標識されているセラミドが好ましく、このようなセラミドとして ^{14}C 、 ^3H 、 ^{13}N 、 ^{15}O などによって放射性標識されるセラミドを挙げることができるが、このうち、 ^{14}C によって放射性標識されたセラミドが、入手のしやすさや安定性及び ^3H 標識された別の脂質との二重標識実験が可能になることを考慮すると、好ましい。

セラミド遊離を促進する薬剤としては、特に制限されないが、上記した本発明のセラミド輸送を促進する薬剤を例示することができる。

5 保温工程において、セラミドを含有する脂質膜とセラミド遊離を促進する薬剤とを混合する方法としては、特に制限されないが、前記薬剤を、NaCl および EDTA を添加したヘベス-NaOH 緩衝液、トリス塩酸緩衝液緩衝液などの緩衝液に分散させて前記脂質膜を添加する方法を挙げることができる。また、保温する方法としては、恒温槽、湯浴槽などによって、15～42℃で10～250分間保温する方法を挙げることができる。

10

分離工程においては、保温した後の混合物を 50,000 x g で 30～60 分間遠心分離して上清を得る。

15 定量工程においては、セラミドが放射性標識されている場合においては、上清に含有されるセラミドの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定することにより上清中に含有されるセラミドを定量することができる。また、上清に含有される脂質を TLC で分離した後、セラミドの放射活性をイメージアナライザーで解析することでも定量することができる。セラミドが放射性標識されていない場合においては、質量分
20 析機器を用いた解析や大腸菌ジアシルグリセロールを用いたセラミド定量法などで測定して上清中に含有されるセラミドを定量することができる。

本発明のセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法について以下
25 に述べる。セラミドを含有する供与膜としては、特に制限されないが、卵黄由来のホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンと

- ブタ組織由来ラクトシルセラミドの混合脂質、または化学合成したホスファチジルコリンとホスファチジリエタノールアミンとラクトシルセラミドの混合脂質にセラミドを添加して調製したものを例示することができる。ラクトシルセラミドのかわりにビオチン化ホスファチジリエタノールアミンを利用することも可能である。このようにして得られたセラミドを含有する供与膜は、窒素、アルゴンなどの不活性ガスを吹き付けること、または減圧乾燥によって乾固することができる。また、供与膜又は乾固した供与膜に NaCl および EDTA を添加したヘベス-NaOH 緩衝液、トリス塩酸緩衝液などの緩衝液を添加して投げ込み式超音波発生器で超音波処理する方法などによって超音波処理することも可能である。

前記混合脂質に添加するセラミドとしては、上記したセラミド遊離を促進する活性の測定方法と同様のものを挙げることができる。

- 15 受容膜としては、卵黄由来のホスファチジルコリンとホスファチジリエタノールアミンまたは合成ホスファチジルコリンと合成ホスファチジリエタノールアミンの混合脂質などを用いることができる。

- 20 受容膜とセラミド輸送を促進する薬剤とセラミドを含有する供与膜との混合方法及び得られた混合物を保温する方法としては、セラミド遊離を促進する活性の測定方法の保温工程と同様に行うことができる。

- 25 保温工程で得られた混合物に添加する選択的膜凝集剤としては、ヒマ豆レクチンを挙げるができる。ヒマ豆レクチンは、ラクトシルセラミドに含まれるガラクトシル基に結合するため、供与膜とヒマ豆レクチンからなる凝集塊を形成し、低速の遠心分離によって供与膜だけを選択

的に沈降させることができる。ラクトシルセラミドのかわりにビオチン化ホスファチジルエタノールアミンを利用する場合は、アビジンやストレプトアビジンなどのビオチン結合試薬を選択的膜凝集剤として使用することができる。また、保冷は、氷浴、冷蔵庫などを用いて、0～4℃
5 で5～15分間行うことができる。

保冷工程で得られた混合物を分離する分離工程においては、選択的膜凝集剤添加後に冷却した混合物を12,000 x gで3～10分間分間遠心分離して上清及び沈降した供与膜を得る。また、得られた供与膜は、SDS、
10 オクチルグルコシド、クロロホルム等に溶解させて定量工程において用いることができる。

定量工程は、セラミド遊離を促進する活性の測定方法と同様に行うことができる。

15

(実施例)

以下、実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、これは単に例示であって、本発明を制限するものではない。なお、下記実施例において、基本的な分子生物学的操作は特に明示がない限り、「モレキュ
20 ークローニング (MolecularCloning) 第2版」[Sambrook, J., Fritsch, E.F.およびManiatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊]もしくは「カレントプロトコル・イン・モレキュ
ーバイオロジー (Current Protocol in Molecular Biology)」[Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J.および
25 Struhl, K. 著、Wiley and Sons 社から1987年から現在に至るまで続刊

中]に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

<実施例で用いた試料>

- ・ヒト・ヘラ・レトロウイルスライブラリー(Human HeLa Retroviral library)、pLIB ベクター、pLIB-EGFP、pEGFP-N3 および SMARTTM RACE cDNA 増幅キットは、クロンテック(Clontech)社製のものを用了。
- ・pcDNA3.1/Hyg(+)、pcDNA3.1/Neo(+)、リポフェクタミンプラス (LipofectAMINE PLUSTM)試薬、pcDNA3.1/V5-His-TOPO(R)ベクター、pCR-Blunt II-TOPO (登録商標名) ベクター、スーパースクリプト・ファーストストランド(SuperScriptTM First Strand)合成システム、および合成オリゴヌクレオチドは、インビトロゲン(Invitrogen)社からそれぞれ購入したものを用了。
- ・ニュートリドーマ(NutridomaTM)SP、フージーン(FuGETM) 6 トランスフェクション試薬、ハイグマイシン B およびプロテアーゼ阻害剤カクテル(CompleteTM EDTA-free)はロシュ・アプライドサイエンス(Roche Applied Science)社から購入したものを用了。
- ・LA PCRTM キットおよびパイロベスト(登録商標名: Pyrobest) DNA ポリメラーゼはタカラ (Takara) 社から購入したものを用了。
- ・KOD-Plus-DNA ポリメラーゼは東洋紡績社から購入したものを用了。
- ・pBlueScript(R) SKII(pBS)ベクターはストラタジーン(Stratagene)社から、購入したものを用了。
- ・プラスミドの小スケール精製には、プロメガ(Promega)社製のウィザードプラス(Wizard PLUS)SV システムを用了。
- ・プラスミドの大スケール精製とゲノム DNA 精製には、カリアゲン (Qiagen)社の HiSpeed プラスミドキットとゲノムチップシステムをそれぞれ使用した。

・制限酵素類は、タカラ社、東洋紡績、またはニューイングランド・バイオラボ(New England Biolabs)社から購入した。

・pET-28a(+)ベクターおよび大腸菌 BL21(DE3)株は、ノバゲン(Novagen)社から購入した。

- 5 ・アレキサフルオロ(登録商標名 Alexa Fluor)594 ヤギ抗マウス免疫グロブリン G、6-〔N-(7-ニトロベンゼゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール-4-イル) アミノ〕カプロイル-D-エリスロースフィンゴシン (6-〔N-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino〕caproyl-d-erythro-sphingosine; C₆-NBD-Cer)およびN-(4, 4-ジフルオロ-5, 7-ジメチル-4-ボラ 3 a, 4 a-ジアザー-s-インダセン-3-ペンタノイル)-D-エリスロースフィンゴシン (N-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-pentanoyl)-d-erythro-sphingosine; C₅-DMB-Cer)はモレキュラー・プローブ (Molecular Probe) 社から購入したものをを用いる。
- 10 ・メチルベータシクロデキストリン(methyl-β-cyclodextrin; MCD)、G418、ポリブレン、抗 FLAG (登録商標名) M2 モノクローナル抗体、脂肪酸除去済みウシ血清アルブミン(BSA)はシグマ社から購入。
- 15 ・卵黄由来ホスファチジルコリン、卵黄由来ホスファチジルエタノールアミンはアバンティ・ポラーリピド(Avanti Polar Lipids)社から購入した。
- 20 ・ポリビニリデン・ジフルオリド(polyvinylidene difluoride; PVDF)膜およびホースラディッシュ・パーオキシダーゼ(horseradish peroxidase; HRP)結合ヤギ抗マウス免疫グロブリン G はバイオラド (Bio-Rad)社から購入した。
- 25 ・BD Living Colors™A.v.モノクローナル抗体はクロンテック社から購入した。

・N-パルミトイル-D-エリスロ-スフィンゴシン(C16-セラミド)は、バイオモル・リサーチ・ラボラトリー社(BIOMOL Research Laboratories)から購入したものをを用いた。

5 ・ブタ組織由来ラクトシルセラミドはマトレーヤ(Matreya)社から購入したものをを用いた。

・ヒマ豆レクチン(RCA120)はホーネン社から購入したものをを用いた。

・薄層クロマトグラフィー(TLC)板はメルク社から購入したものをを用いた。

10 ・3-(4,5-ジメチル-2-チアゾイル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムブロミド(MTT)は同仁化学研究所から入手したものをを用いた。

・マウス抗G28モノクローナル抗体はストレスゲン(StressGen)社から購入したものをを用いた。

15 ・L-[2,3,4,5-³H]アルギニン(71 Ci/mmol), L-[U-¹⁴C]セリン(155 mCi/mmol)、[メチル-¹⁴C]コリン(55 mCi/mmol)、[1a,2a(n)-³H]コレステロール(49Ci/mmol)、メガプライム(Megaprime)DNAラベリングキットおよび増感化学発光(enhanced chemiluminescence;ECL)システムはアマシヤム・バイオサイエンス(Amersham Bioscience)社から購入したものをを用いた。

20 ・[パルミトイル-1-¹⁴C] N-パルミトイル-D-エリスロ-スフィンゴシン(55 mCi/mmol)、[オレオイル-1-¹⁴C]ジオレオイル-rac-グリセロール(55mCi/mmol)、[コリンメチル-¹⁴C]スフィンゴミエリン(55 mCi/mmol)、[ジパルミトイル-1-¹⁴C] L- α -ジパルミトイルホスファチジルコリン(55mCi/mmol)、[2-パルミトイル-9,10-³H(N)] L- α -ジパルミトイル
25 ホスファチジルコリン (30~60Ci/mmol)、D-エリスロ-[3-³H]スフィンゴシン(20Ci/mmol)はアメリカン・ラジオラベル・ケミカル社(American

Radiolabeled Chemicals, Inc.)から購入したものを用いた。ただし、購入した [パルミトイル-1-¹⁴C] N-パルミトイル-D-エリスロ-スフィンゴシンに分解物が混在しているよう場合は、TLC で精製した後に使用した。

・ [α-³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) はパーキンエルマー (PerkinElmer) 社か

5 ら、それぞれ購入したものを用いた。

・ SMARTTM RACE cDNA 増幅を用いて作成した 5' -RACE Ready CHO cDNA および 3' -RACE Ready CHO cDNA は、国立感染症研究所・細胞化学部 (現・九州大学理学系大学院) の久下理博士から分与されたものを使用した。

・ ライセニン は、全薬工業株式会社の関沢良之博士から分与されたもの
10 を用いた。

・ (1R,3R)N-(3-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-フェニルプロル)ドデカンアミド [(1R,3R)HPA-12] は、東京大学大学院薬学系研究科の小林修教授から分与されたものを用いた。

・ CHO 細胞 cDNA ライブラリーは、CHO-K1 細胞由来の mRNA から、インビ
15 トロゲン社のスーパースクリプト (SuperScriptTM) プラスミドシステムを用いて作成したものを用いた。

・ PBS/nFL ベクターは、pBS 由来の改変ベクターであり、アミノ末端に FLAGTM エピトープ配列が付加できるようなマルチクローニング部位を持つように、本発明者が、pBS ベクターから作成したものを用いたが、
20 下に詳述する PBS/nFL ベクターを用いて行う実験操作は、pBS ベクターを用いて行うことも可能である。

<実施例で使用した分析機器>

・ PCR 機器と DNA 配列解析機器には、アプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製のジーンアンプ (登録商標名 GeneAmp) PCR シス
25 テム 2700 と ABI PRIZMTM 310 を用いた。

・ TLC など で 分 離 し た 放 射 性 物 質 の イ メ ー ジ 解 析 に は 、 富 士 フ ィ ル ム 社 の B A S 2000 イ メ ー ジ ア ナ ラ イ ザ ー を 用 い た。

・ 液 体 シ ン チ レ ー シ ョ ン カ ウ ン タ ー は ア ロ カ (Aloka) 社 の LSC-5100 を 、 蛍 光 ス ペ ク ト ル 測 定 装 置 に は 、 日 立 製 作 所 の モ デ ル F-3000 を そ れ ぞ れ 用
5 い た。

・ 蛍 光 顕 微 鏡 に は カ ー ル ・ ツ ア イ ス 社 の ア キ シ オ バ ー ト （ 登 録 商 標 名 Axiovert） S 1 0 0 T V を 、 チ ャ ー ジ ド ・ カ ッ プ ル ド ・ デ バ イ ス (charged coupled device; CCD) カ メ ラ に は 浜 松 ホ ト ニ ク ス 社 の デ ジ タ ル C C D カ メ
10 ラ C4742-95-12 を 使 用 し た。

10 <実 験 で 用 い た P C R プ ラ イ マ ー>

本 実 験 で 用 い た P C R プ ラ イ マ ー を 表 1 に 示 す。

表 1

番号	配列番号	プライマー名	オリゴヌクレオチド配列
#1	9	pLIB (1470-1491)	5'-GCCCTCACTCCTTCTCTAGGCG-3'
#2	10	pLIB (1631-1605)	5'-CTTAAGCTAGCTTGCCAAACCTACAGG-3'
#3	11	EcoRI/hCert	5'-CAGAATTCACCATGTCGGATAATCAGAGCTGG-3'
#4	12	EcoRI/FL/hCert	5'-CAGAATTCACCATGGACTACAAGGACGACGACAAAA TGTCGGATAATCAGAGCTGG-3'
#5	13	hCert/XhoI	5'-GGCTCGAGCTAGAACAAAATAGGCTTTCTGC-3'
#6	14	hCert/FL/XhoI	5'-GGCTCGAGCTATTTGTCGTCGTCCTTGTAGTCGAAC AAAATAGGCTTTCTGC-3'
#7	15	d26ex/fusion-R	5'-CAGAGGCACTGACTAGATCAATGGAAGACATGGAGG AAGAGCGACTATAGGGCTTTGGACAAATCTATGTGTCC -3'
#8	16	d26ex/fusion-F	5'-CCATTGATCTAGTCAGTGCCTCTGATGATGTTTACA GATTCAGCTCCCAGGTTGAAGAGATGGTGCAGAACC-3'
#9	17	EcoRI/dPH	5'-CAGAATTCACCATGGAATCTGGATATGGATCTGAAT C-3'
#10	18	dSTART/XhoI	5'-GGCTCGAGCTATTGGACAAATCTATGTGTCCC-3'
#11	19	d760-1515vf	5'-CTCTTCAACCTTAGTCTTGTGCTGTTCAATGGC-3'
#12	20	d760-1515vs	5'-CAGCACAAGACTAAGGTTGAAGAGATGGTGCAG-3'
#13	21	Hind3/Cert3-24	5'-CACAAGCTTCGGATAATCAGAGCTGGAAC-3'
#14	22	Cert351-331/Bgl2 XhoI	5'-GGCTCGAGCTAAGATCTAGTCTTGTGCTGTTCAATG GC-3'
#15	23	Hind3/Cert352-37 5	5'-CACAAGCTTCGGAATCTGGATATGGATCTGAATCC- 3'
#16	24	Cert1107-1087/Bg 12XhoI	5'-GGCTCGAGCTAAGATCTTTGGACAAATCTATGTGTC CC-3'
#17	25	Hind3/Cert1108-1 128	5'-CACAAGCTTCGAAGGTTGAAGAGATGGTGCAG-3'
#18	26	Cert1794-1774/Bg 12XhoI	5'-GGCTCGAGCTAAGATCTGAACAAAATAGGCTTTCTT GC-3'
#19	27	mGP (h1196-1163)	5'-GAGAAAGTGTAGCAAGGATTCCAGCAGTAGTTGC-3 ,
#20	28	cGP (984-1015) '	5'-GAAGATGACTTCCTACAACCTGTTCTGATGG-3'
#21	29	EcoRI/CHOGPv	5'-TAGAATTCAGTGGCGCAGCTCTCG-3'
#22	30	CHOGPv/XhoI	5'-GGCTCGAGGAATGTCACACAGCCTTGC-3'
#23	31	CHOGP (1891-1911)	5'-AAGATCCCAGCCTTGAAGT-3'
#24	32	hCert/XhoI-GFP	5'-GGCTCGAGGAACAAAATAGGCTTTCTGC-3'

<細胞培養方法>

・CHO-K1細胞はアメリカンタイプカルチャーコレクション (American Type Cell Collection) から購入し、本発明者らによって継代、保存しているものを用いた。

・CHO細胞変異株・LY-A株は、本発明者ら(Hanada, K., Hara, T., Fukasawa, M., Yamaji, A., Umeda, M. and Nishijima, M. (1998) J. Biol. Chem. 273, 33787-33794.)が樹立したものを使用した。Kitamuraら(Gene Ther. 7, 1063-1066., 2000)により樹立されたレトロウイルスパッケージング細胞であるPlat-E細胞は、その樹立者である東京大学・医科学研究所・北村俊雄教授から分与されたものを使用した。

10 ・CHO細胞は、Ham's F12培地に10%新生ウシ血清(NBS)とペニシリンG(100単位/mL)および硫酸ストレプトマイシン(100 μ g/mL)を補充した細胞培養培地(F12/NBS)中、温度33°Cにおいて、5%のCO₂雰囲気では通常は培養した。Plat-E細胞の場合は、ダルベッコの最小必須培地に10%胎児血清(FBS)とペニシリンG(100単位/mL)および硫酸ストレプトマイシン(100 μ g/mL)を補充した細胞培養培地(DMEM/FBS)中、温度37°Cにおいて、5%のCO₂雰囲気では培養した。

・また、ニュートリドーマ培地(1%ニュートリドーマSPおよび25 μ g/mLのゲンタマイシンを含有するHam's F12培地)もしくは、ニュートリドーマB0培地(ニュートリドーマ培地に10 μ Mのオレイン酸ナトリウム・BSA複合体および0.1%のFBSを添加した培地)は、Hanadaら(J. Biol. Chem. 267, 23527-23533., 1992)によって調製されたものを、スフィンゴ脂質欠乏培地として用いた。

製造例

25 <本発明の薬剤の有効成分であるタンパク質の製造>

以下の手順でCERTタンパク質及びその組換えタンパク質を製造した。

<LY-A2 株樹立の方法>

CHO 細胞は、マウスレトロウイルス受容体であるマウス由来陽性アミノ酸輸送体(mCAT-1)が発現していないので、そのままではマウスレトロウイルスベクターを感染させることができない。そこで、LY-A 株に

5 mCAT-1 cDNA を安定発現させた株(LY-A2 株と命名)を以下のように樹立した。先ず、Albritton, L.M ら (Cell 57, 659-666., 1989) に記載されるプラスミド pJET (米国・Brigham & Women' s Hospital の James Cunningham 博士より供与されたもの) を、制限酵素 Stu I および Bam HI で処理して切り出した mCAT-1 cDNA を、哺乳動物細胞発現プラスミド・

10 pcDNA3.1/Hyg(+)の Eco RV/Bam HI 部位に挿入して mCAT-1/pcDNA3.1/Hyg を作成した。mCAT-1/pcDNA3.1/Hyg を Bgl II で処理して直線化した後、リポフェクタミン・プラス試薬を用いて、LY-A 細胞に導入した。ハイグマイシン B(250 μ g/mL)を添加した F12/NBS 培地中で培養し、ハイグマイシン B 耐性細胞を選択した後、限外希釈法によって 6 つのハイグマイシン B 耐性株を精製した。これらの株の mCAT-1 発現レベルとその安定性を

15 放射性アルギニン取り込みを指標にして検討し、最も安定的に発現する株を LY-A2 株とした。放射性アルギニン取り込みアッセイ方法は Wang ら (J. Biol. Chem. 267, 23617-23624., 1992) の方法に準じた。ただし、取り込み反応液は、25 mM ヘベス・KOH (pH 7.2) 緩衝液に 115 mM KCl、

20 0.9 mM CaCl_2 , 0.81 mM MgSO_4 , 5 mM D-グルコースおよび 0.1 mM L-[^3H]アルギニン(1.25 μ Ci/mL)を添加したものをを用い、反応は 25° C で 30 秒間行った。

<ヒト cDNA ライブラリーを発現するレトロウイルス粒子の調製方法>

ヘラ(HeLa)細胞に由来する cDNA から構築されているレトロウイルス

25 ライブラリーのプラスミドを、フージーン・トランスフェクション試薬を用いて、パッケージング細胞である Plat-E 細胞に導入した。トランスフ

エクシオン処理開始の次の日に培地を交換し、さらに24時間培養後、培地を回収する。回収培地を、先ず、150 x gで5分間遠心し、その上清をついで1350 x gで5分間遠心した上清をウイルス粒子液とした。調製したウイルス粒子液-80°Cに冷凍保存し、使用直前に融解して感染実験に使用した。

<クローン化されたcDNAを発現するレトロウイルス粒子の調製方法>

発現したいcDNAをpLIBベクターに組み込んだプラスミドを、上述した方法と同様な方法で、Plat-E細胞へ導入し、ウイルス粒子液を調製した。緑蛍光タンパク質(GFP)を発現するためには、pLIB-EGFPをPlat-E細胞へ導入し、ウイルス粒子液を調製した。

<LY-A2細胞へのレトロウイルス感染方法>

感染実験の細胞培養に用いるNBSは、補体因子を失活させるために58°Cで30分間処理したものを使用した。2百万個のLY-A2細胞を100-mm直径培養皿に播種して、10 mL F12/NBS中、37°Cで一晩培養した。次の日、ヒトcDNAライブラリー発現レトロウイルス粒子液をF12/NBSで10倍希釈し、それに濾過滅菌したポリブレン(800 µg/mL PBS)を最終濃度4 µg/mLとなるように添加したものを感染培地とした。細胞の培養液を培養皿当たり5 mLの感染培地に交換して、37°Cで6時間培養した。培地を10 mLのF12/NBSに再び交換して、さらに一晩培養した。細胞をトリプシン処理で回収し、150-mm直径培養皿に一皿当たり2百万細胞を播種した。10 mLのF12/NBS中、33°Cで一晩培養した後、次節のMCD選択に供した。なお、pLIB-EGFPベクターから調製したレトロウイルス粒子液を用いた予備実験から、ここで行った感染条件下では、約50%のLY-A2細胞が感染すると見積もられた。

<MCD耐性回復株を選択する方法>

ここで用いた機能回復株選択法は、SM 含量の減少した細胞がコレステロール引き抜き試薬・メチルシクロデキストリン(MCD)に高感受性になり、SM 含量が回復した細胞が MCD に対する耐性を回復するという知見をもとにして行った。前節で述べたように播種して 33° C で一晚培養した感染細胞を、10 mL の無血清 F12 培地で二回洗浄した後、25 mL の 10 mM MCD/F-12 (無血清 F-12 培地に溶かした 10 mM MCD を濾過滅菌したもの)中、37° C で一時間保温した。培養皿を 12 mL の PBS で三回洗浄後、25 mL の F12/NBS を加えて 33° C で 7 ~ 10 日間培養した。生き残った細胞をトリプシン処理によって播種し、再び同様の MCD 処理に供した。ただし、二度目以降の MCD 処理では、細胞数が少ないので、細胞培養スケールを 60-mm 直径培養皿とした。総計 4 回の MCD 処理をして生き残った細胞に関して、限外希釈を行って細胞を精製した。精製した細胞の中から MCD 耐性、ライセニン感受性および SM 生合成が CHO-K1 細胞でみられるレベルに回復している細胞株・LY-A2R 細胞を得た。

15 <LY-A2R 細胞に導入されている cDNA を増幅し、クローニングする方法>

LY-A2R 細胞に導入されている cDNA をゲノミック PCR で増幅し、クローニングした。すなわち、LY-A2R 細胞から調製したゲノム DNA をテンプレートとして、かつ、pLIB ベクター中の配列に相当する合成オリゴヌクレオチド(表 1 のプライマー # 1 および # 2)をプライマーとして、PCR を行った。増幅した約 2.4 キロ塩基ペア(kbp)の DNA を、pcDNA3.1/V5-His-TOPO ベクターに挿入した。得られたプラスミドを LY-A 細胞に、リポフェクタミンプラスを用いて導入すると、MCD 耐性度が CHO-K1 細胞レベルに回復する細胞が観察された。当該 2.4 kbp DNA の配列を決定したところ、Raya, A ら (J. Biol. Chem. 275, 40392-40399., 2000) によってすでに報告されているヒト GPBP Δ 26 タンパク質の cDNA

配列 (GenBank 番号 : AF232930) と本質的に同一であることがわかった。本明細書にすでに詳述したように、この遺伝子産物の細胞内での機能はセラミド輸送であることが明らかになったので、発明者らは、GPBP Δ 26 タンパク質と本質的に同一の配列を有するタンパク質を CERT タンパク質と命名した。

5 <ヒト CERT の読み枠配列(open-reading frame, ORF)のクローニング方法>

ヒト CERT タンパク質の ORF を以下の方法でクローニングした。クロンテック社製のヒト・ヘラ・レトロウイルスライブラリーをテンプレートとし、かつ、表 1 のプライマー # 3 及び # 5 を用いて PCR を行った。なお、前向きプライマーであるプライマー # 3 には Eco RI 部位が、逆向きプライマーであるプライマー # 5 には Xho I 部位がそれぞれ付加してある。増幅した約 1.8 kbp DNA を Eco RI と Xho I で処理後、pBS ベクターの Eco RI-Xho I 部位に挿入してクローニングした。得られたプラスミドは、pBS/hCERT と名付けた。ここでクローニングした cDNA の配列は、Raya, A ら (J. Biol. Chem. 275, 40392-40399., 2000) によってすでに報告されているヒト GPBP Δ 26 タンパク質の ORF 配列 (GenBank 番号 : AF232930) と同一であることを確認した。

15 <ヒト CERT_L をコードする DNA の作成方法>

20 GPBP Δ 26 タンパク質 (すなわち実質的に CERT タンパク質) の別スプライシング型として、78 bp のエキソンがさらに加わり、結果として 26 アミノ酸残基大きい産物である GPBP (すなわち実質的に CERT_L) が様々な種類の細胞で発現していることが知られている。ヒト CERT_L (hCERT_L) に相当する ORF 配列を以下のように作成し、クローニングした。まず、pBS/hCERT をテンプレートにし、かつ、表 1 に記載のプライマー # 3 と
25 # 7 を用いて PCR を行い、約 1.2 kbp の増幅 DNA を得た。一方で、pBS/hCERT

をテンプレートにし、かつ、表 1 に記載のプライマー # 8 と # 5 を用いて PCR を行い、約 0.7 kbp の増幅 DNA を得た。次に、これら 1.2 kbp および 0.7 kbp DNA を等モルで混合したものをテンプレートにし、かつ、表 1 に記載のプライマー # 3 と # 7 とを用いて PCR を行い、約 1.9 kbp の増幅 DNA を得た。この 1.9 kbp DNA の Eco RI と Xho I 処理産物を pBS ベクターの Eco RI-Xho I 部位に挿入してクローニングしたプラスミドを pBS/hCERT_L と名付けた。1.9 kbp DNA の配列は、すでに Raya, A ら (J. Biol. Chem. 274, 12642-12649, 1999) によって報告されている hGPBP タンパク質の ORF の配列 (GenBank 番号: AF136450) に一致していることを確認した。

<CERT の各種欠失変異体をコードする DNA の作成方法>

pBS/hCERT をテンプレートにし、かつ、表 1 に記載のプライマーを以下のように組み合わせて PCR を行い、CERT タンパク質の各種欠失変異体 ORF をコードする増幅 DNA を得た。PH ドメイン欠失変異体(hCERT Δ PH タンパク質)をコードする増幅 DNA を得るために、プライマー # 9 と # 5 を、START ドメイン欠失変異体(hCERT Δ ST タンパク質) をコードする増幅 DNA を得るために、プライマー # 3 と # 10 をそれぞれ用いた。また、MR ドメイン欠失変異体(hCERT Δ MR タンパク質) をコードする増幅 DNA を得るために、プライマー # 3 と # 11 を用いた PCR による約 350 bp 産物と、プライマー # 12 と # 5 を用いた PCR による約 770 bp 産物とをそれぞれ得た後、これら PCR 産物 DNA を等モルで混合したものをテンプレートにし、プライマー # 3 と # 5 を用いて PCR を行い、hCERT Δ MR タンパク質をコードする約 1.1 kbp の増幅 DNA を得た。これら欠失変異体をコードする DNA は、Eco RI と Xho I 処理して、pBS ベクターの Eco RI-Xho I 部位に挿入してクローニングした。PH ドメインのみを持つ欠失変異体 (PHhCERT タンパク質) をコードする増幅 DNA を得るために、プライマー

#13と#14を、MRドメインのみを持つ欠失変異体(MRhCERTタンパク質)をコードする増幅DNAを得るために、プライマー#15と#16を、STARTドメインのみを持つ欠失変異体(SThCERTタンパク質)をコードする増幅DNAを得るために、プライマー#17と#18を、それぞれ用いてPCR産物を得た。これらの増幅DNAのHind IIIとXho I処理産物をpBS/nFLベクターのHind III-Xho I部位に挿入してクローニングした。

5

<抗FLAG抗体で認識できるアミノ酸配列のhCERTタンパク質およびhCERT_Lタンパク質への付加方法>

抗FLAG抗体で認識できるAsp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Lys配列(FL配列)をCERTのアミノ末端に付加するために、pBS/hCERTをテンプレートにし、かつ、表1に記載のプライマー#4と#5を用いてPCRを行った。この増幅DNAのEco RIとXho I処理産物をpBSベクターのEco RI-Xho I部位に挿入してクローニングしたプラスミドをpBS/FL-hCERTと命名した。FL配列をCERT_Lのアミノ酸末端に付加の際には、テンプレートとしてpBS/hCERT_Lを用いて同様のPCRを行い、当該産物をクローニングした

10

15

プラスミドをpBS/FL-hCERT_Lと命名した。

<CERTタンパク質およびその関連タンパク質を哺乳動物で発現させるプラスミドの作成方法>

レトロウイルスベクター感染を介する発現のためには、pBSベクターのEco RI-Xho I部位にクローニングした各種DNAをEco RI-Xho I処理で切り出して、それらをレトロウイルス発現用pLIBベクターのEco RI-Sal I部位に挿入して得られたプラスミドを用いた。ヘラ細胞cDNAライブラリーからPCR増幅によってクローニングしたhCERTのORFをpLIBレトロウイルスベクターに挿入して、プラスミドpLIB/hCERTを得た。この方法は、CERTタンパク質の組換えタンパク質にも適用することができる。一方、リポフェクションを介する発現のためには、pBSベク

20

25

ターの Eco RI-Xho I 部位にクローニングした各種 DNA を Eco RI-Xho I 処理で切り出した DNA を、pcDNA3.1/Neo(+)ベクターの Eco RI-Xho I 部位に挿入して得られたプラスミドを用いた。ヘラ細胞 cDNA ライブラリーから PCR 増幅によってクローニングした hCERT の ORF を pcDNA3.1/Neo(+)ベクターに挿入して、プラスミド pcDNA3.1/hCERT を得た。

＜MCD およびライセニンに対する感受性の定量方法＞

12 穴培養皿の各穴あたりに 10 万個の細胞を 1 mL の F12/NBS 培地中に播種し、33° C で一晚培養した。培養皿上の細胞を 1 mL の無血清 F12 培地で 2 回洗浄後、1 mL の 10 mM MCD/F12 もしくはライセニン(25 ng/mL)/F12 を添加した。なお、無血清 F12 のみを 1 mL 添加したものを対照とした。37° C で 1 時間保温後、1 mL のリン酸緩衝生理的食塩水(PBS)で 2 回洗浄した。ついで、1 mL の MTT (0.5 mg/mL)/F12 を添加して、37° C で 1 時間保温した。生じた還元型 MTT の相対量を文献 Hanada ら(J. Biol. Chem. 273, 33787-33794., 1998) の方法で測定した。

＜CERT タンパク質をコードする遺伝子の CHO 細胞への導入方法および安定発現株の分離方法＞

前節で作成したレトロウイルスベクター由来のウイルス粒子を感染させることで、当該遺伝子を LY-A2 細胞に発現させた。すなわち、pLIB/hCERT 由来のウイルス粒子を LY-A2 に感染させ、当該遺伝子を LY-A2 細胞に発現させた。hCERT を発現させた場合は、限外希釈法によって精製した形質転換株も分離し、この株を LY-A2/hCERT と命名した。4 日間培養した後、上記した方法により MCD およびライセニンに対する感受性を調べた。対照として、cDNA を挿入していない pLIB ベクター由来のウイルス粒子を LY-A2 に感染させた細胞についても MCD およびライセニンに対する感受性を調べた。さらに、CHO-K1 細胞についても MCD お

よびライセニンに対する感受性を調べた。MCD およびライセニンに対する感受性測定の結果を図 2 に示す。

また、前節で作成した pcDNA3.1/Neo(+)由来の発現プラスミドを、リ
5 ポフェクタミンプラスを用いて LY-A 細胞に導入し、当該遺伝子を発現させた。すなわち、pcDNA3.1/hCERT を遺伝子導入して、当該遺伝子を LY-A 細胞に発現させた。hCERT の安定発現株を精製するには、先ず、G418 耐性細胞を選択し、それらを限外希釈法によって精製した。その後、上記した方法により MCD およびライセニンに対する感受性を調べ、MCD 感受
10 性が野生型レベルに回復しているものを分離した。この形質転換株は LY-A/hCERT と命名した。

pLIB/hCERT 由来のウイルス粒子を感染させた LY-A2 細胞から、形質転換株を精製し、精製株である LY-A2/hCERT 細胞の MCD およびライセニン
15 に対する反応性をさらに詳細に調べた。結果を図 3 (A) に示す。

<細胞の各種リン脂質の含有量の決定方法>

F12/NBS 培地 20 mL 中に 150-mm 直径培養皿当たり 3×10^6 の CHO-K1 細胞、LY-A2 細胞、又は LY-A2/hCERT 細胞を播種し、33℃で一晩培養した。無血清 F12 培地 10 mL で 2 回洗浄後、ニュートリ
20 ドーマ B0 培地 20 mL 中でさらに二日間培養した。PBS で洗浄後、細胞を掻取り法によって回収し、PBS に再懸濁し、Bligh ら (Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917, 1959) に記載の方法で脂質を抽出した。抽出した脂質は、クロロホルム/メタノール/酢酸/ H_2O (容量比、25:15:4:2) を展開溶媒とした TLC を用いて分離した。TLC プレート上の分離リン
25 脂質をヨード蒸気で呈色した後、各リン脂質をバンドをプレートから掻き出した。掻き出したリン脂質は、Rouser ら (Lipids 1, 85-86., 1966)

の方法によりリン含有量を測定することで定量した。結果を図3 (B) に示す。

< [^{14}C] セリンおよび [^{14}C] コリンを用いた脂質の代謝標識実験方法 >

- 5 CHO-K1細胞、LY-A2細胞、LY-A2/hCERT細胞をそれぞれF12/NBS培地5 mL中に60-mm直径培養皿あたり 1.0×10^6 の細胞密度で播種し、33°Cで一晩培養した。次いで、ニュートリドーマ培地1.5 mLに培地交換し、[^{14}C] セリン ($0.75 \mu\text{Ci}$) または [^{14}C] コリン ($1.0 \mu\text{Ci}$) を加えた後、[^{14}C] セリン添加の場合は2時間、[^{14}C] コリン添加の場合は5時間33°Cで培養した。ただし、(1R, 3R)HPA-12の影響を分析する場合、 $1 \mu\text{M}$ の(1R, 3R)HPA-12を添加した(対照実験には、薬剤を溶かすのに用いたジメチルスルフォキシドを最終濃度0.01%と合わせるように添加した)ニュートリドーマ培地1.5 mL
- 10 中で4°Cで15分間前処理した後、[^{14}C] セリンを添加して、33°Cにおいて2時間培養した。細胞は冷却PBS 2 mLで2回洗浄後、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS) 900 μL で溶解し、そして溶解物の800 μL および20 μL は、それぞれ、脂質抽出およびタンパク質濃度の決定に用いた。[^{14}C] セリンで標識した脂質の分析のために、脂質は、酢酸メチル/n-プロパノール/クロロホルム/メタノール/0.
- 15 25%KCl (25:25:25:10:9,容積比)を展開溶媒としたTLCを用いて分離した。[^{14}C] コリンで標識した脂質の分析のために、脂質は、クロロホルム/メタノール/酢酸/ H_2O (25:15:4:2、容積比)を展開溶媒としたTLCを用いて分離した。プレート上で分離された放射性脂質は、イメージアナライザーで検出・解析した。[^{14}C] セリンを用いた結果を図4 (A)に、[^{14}C] コリンを用いた結果を図4 (B)に示す。
- 20
- 25

<酵素活性測定方法>

S M合成酵素活性のアッセイは、Hanada ら (Biochim. Biophys. Acta 1086, 151-156., 1991) の方法により、 $C_6-NBD-Cer$ を基質として用いて実施した。ただし、CHO-K1 細胞、LY-A2 細胞、

- 5 LY-A2/hCERT 細胞からそれぞれ調製された膜画分を酵素源として用いた。結果を図 5 に示す。

< $C_5-DMB-Cer$ を用いた細胞標識と蛍光顕微鏡観察の方法>

- 天然セラミドの小胞体 (以下、ER と述べる) からゴルジ体への ATP 依存性輸送の活性は、蛍光性セラミド類似体である $C_5-DMB-Cer$ の ER からゴルジ体への再分配の解析から定性的に評価することができることを本発明者ら (J. Cell Biol. 144, 673-685., 1999) は、すでに明らかにしている。以下に詳述するように、ER を含む種々の細胞内器官膜のパルス標識のために細胞を 4℃ で、30 分間 $C_5-DMB-Cer$ に曝し、洗浄後、33℃ で、15 分間蛍光顕微鏡で追跡した。
- 15 $C_5-DMB-Cer$ を用いた細胞標識と蛍光顕微鏡観察の方法は、それぞれ Yasuda ら (J. Biol. Chem. 276, 43994-44002., 2001) の方法及び Fukasawa ら (J. Cell. Biol. 144, 673-685., 1999) の方法によって行った。すなわち、ガラス製カバーガラス上に生育した CHO-K1 細胞、LY-A2 細胞、LY-A2/hCERT 細胞をそれぞれ、1 μ M の $C_5-DMB-Cer$ を含む F12 培地中で、4℃ で 30 分処理後、F12 培地 1 mL で 3 回洗浄した。1 mL のニュートリドーマ培地を加え、追跡をしない場合は、すぐに PBS で洗浄をし、一方、追跡をする場合は、33℃ で 15 分間培養後に PBS で洗浄した。次に、0.125% グルタルアルデヒドの PBS 溶液中で、4℃ で、5 分間で固定した。試料は、固定後直ちに
- 25 蛍光顕微鏡下で観察およびデジタル CCD カメラ撮影した。結果を図 6 に示す。

本発明者らは、さらに、セラミドが ER から SM 合成の場へと移動する輸送経路には、A T P に依存する経路と依存しない経路の少なくとも 2 種類があり、LY-A 細胞では、A T P 依存性輸送経路が欠損していること
5 を本発明者らは、すでに明らかにしている。hCERT の導入で回復したセラミド輸送経路が、A T P 依存性輸送経路であるか否かを調べるために、C₅-DMB-Cer の細胞内移動に対する ATP 枯渇の影響を解析した。なお、ATP 枯渇条件を用いる場合には、F 1 2 培地 1 mL で 3 回洗浄した後に、エネルギー阻害剤 (50 mM デオキシグルコースと 5 mM アジ化
10 ナトリウム) を添加した 1 mL のニュートリドーマ培地中、33°C で 15 分間前処理した後に、C₅-DMB-Cer 処理して PBS で洗浄をして同様に固定して観察及び撮影を行った。また、追跡をする場合は、C₅-DMB-Cer 処理した後に、さらにエネルギー阻害剤添加培地で 33°C で 15 分間培養後に PBS で洗浄し、同様に固定して観察及び撮影
15 を行った。結果を図 7 に示す。

<セラミド輸送阻害剤の影響>

A T P 依存性セラミド輸送経路に対する選択的阻害剤・(1R,3R)HPA-12 が、本発明者ら (J. Biol. Chem. 276, 43994-44002., 2001) によってすでに発見されている。hCERT の導入で回復したセラミド輸送経路が、
20 (1R,3R)HPA-12 感受性の輸送経路であるか否かを調べるために、SM 生合成に対する (1R,3R)HPA-12 処理の影響を放射性セリンを用いた脂質代謝標識実験によって解析した。結果を図 8 に示す。

<hCERT 安定発現による LY-A 細胞のセラミド輸送機能の回復>

レトロウイルス受容体を導入していない元来の LY-A 細胞においても
25 hCERT 発現によってセラミド輸送機能が回復することを以下に述べるようにして確かめた。hCERT を挿入した pcDNA3.1/Neo プラスミドを LY-A

細胞にリポフェクションで導入し、G418 耐性細胞を選択後、限外希釈によって、形質転換株・LY-A/hCERT を精製した。その後、MCD に対する感受性の測定、 $[^{14}\text{C}]$ セリンおよび $[^{14}\text{C}]$ コリンを用いた脂質の代謝標識実験、及び $\text{C}_5\text{-DMB-Cer}$ を用いた細胞標識と蛍光顕微鏡観察を同様に行った。結果をそれぞれ図 9 (A) ~ (C) に示す。

5 <LY-A 細胞の欠損は hCERT_L 発現によっても相補することの証拠>

CERT タンパク質及び 26 アミノ酸残基大きな別スプライシング型産物である CERT_L タンパク質が LY-A 細胞の欠損を相補するか否かを検証した。アミノ末端に FL 配列を付加した CERT タンパク質及び CERT_L タンパク質を発現するためのレトロウイルスをそれぞれ LY-A2 細胞に感染させた。得られた (LY-A2+FL-hCERT) 細胞及び (LY-A2+FL-hCERT_L) 細胞の MCD 耐性を<MCD 耐性回復株を選択する方法>に記載される方法に準じて生き残った細胞数を数えることによって測定した。また、遺伝子を挿入していない pLIB ベクターを用いて LY-A2 細胞を感染させて得られた

10 (LY-A2 + 空ベクター) 細胞、CHO-K1 細胞、LY-A2 細胞も同様に MCD 耐性を測定した。結果を図 10 (A) に示す。

<抗 FLAG 抗体また抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロット解析方法>

細胞破碎液の調製およびウエスタンブロットの方法は、それぞれ Hanada ら (J. Biol. Chem. 273, 33787-33794., 1998) の方法および

20 Bejaoui ら (J. Clin. Invest. 110, 1301-1308., 2002) の方法に準じた。すなわち、冷却 PBS で洗浄した (LY-A2+FL-hCERT) 細胞、(LY-A2+FL-hCERT_L) 細胞、及び (LY-A2 + 空ベクター) 細胞をそれぞれ搔取り法によって回収し、HSEI 緩衝液[10 mM ヘベス-NaOH 緩衝液(pH 7.5)に 250 mM スクロース、1 mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、およびプロテアーゼ阻害剤カクテルを添加したもの]に懸濁後、投げ込み式超音波発生器

25 を用いた超音波処理によって、細胞を破碎した。この破碎液を、SDS-ポ

リアクリルアミドゲル電気泳動に供し、PVDF 膜に転写した。この転写膜に対して、ブロッキング処理、第一次抗体処理および洗浄処理、第二次抗体処理および洗浄処理、そして ECL 処理を施し、免疫学的反応蛋白質を検出した。GFP または GFP 融合 CERT タンパク質を検出する目的には BD
5 Living Colors™ A.v.モノクローナル抗体を、それぞれ第一次抗体として用いた。第二次抗体としては HRP 結合ヤギ抗マウス免疫グロブリン G を用いた。結果を図 10 (B) に示す。

<CHO-K1 細胞由来 CERT タンパク質の cDNA クローニング方法>

CHO-K1 細胞由来 CERT タンパク質の cDNA をクロンテック社 SMART RACE
10 cDNA 増幅キットを用いて、cDNA 末端の迅速増幅(rapid amplification of cDNA ends; RACE)を行うことでクローニングした。すなわち、当該キットで作成した 5' -RACE Ready CHO cDNA をテンプレートとし、表 1 に記載のプライマー# 19 を遺伝子特異的プライマーとして、PCR を行った。この際、DNA ポリメラーゼとしてパイロベスト DNA ポリメラーゼを用い
15 た。一方で、3' -RACE Ready CHO cDNA をテンプレートとし、表 1 のプライマー# 20 を遺伝子特異的プライマーとして PCR を行った。これら 5' -RACE 反応および 3' -RACE 反応によって、それぞれ約 1.2 kbp および約 1.4 kbp の増幅差物を得た。これら産物を pCR-Blunt II-TOPO ベクターにクローニング後、DNA 配列を決定した。決定した配列中の重複領域を鑑み、CHO-K1 細胞由来 CERT (cCERT)の cDNA 全長の配列 2473 bp を
20 決定した。次に、cCERT の完全な ORF を含む DNA を得るために、CHO 細胞 cDNA ライブラリーをテンプレートとし、かつ、表 1 に記載のプライマー # 21 と # 22 を用いて PCR を行った。増幅した約 1.9 kbp の DNA を Eco RI および Xho I で処理し、pBS ベクターの Eco RI-Xho I 部位に挿入した
25 プラスミドを pBS/cCERT と名付けた。

<CHO 細胞由来 CERT タンパク質のノザンプロット解析の方法>

CHO-K1 細胞および LY-A 細胞から総 RNA をイソゲン(isogen; 日本ジーン社製)を用いて調製した。また、プローブとしては、上述の cCERT 5' -RACE で得た約 1.2 kbp DNA を、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ およびメガプライム DNA ラベリングキットを用いて ^{32}P 標識したものを使用した。ハイブリダイズ後の洗浄条件はストリンジェント(stringent)条件で行った。転写膜上の放射性パターンの解析は BAS 2000 イメージアナライザーを用いて行った。また、内部標準のための転写膜再プローブ実験は、和光純薬工業から購入した β アクチン DNA 断片を ^{32}P 標識したものをプローブとして行った。結果を図 11 に示す。

10 <LY-A 細胞由来の cCERT ORF のクローニング方法>

LY-A 細胞から総 RNA をイソゲンを用いて調製した。次に、この RNA から、スーパースクリプト第 1 鎖合成システムを用いて cDNA を調製した。次に、本 cDNA をテンプレートとし、かつ、表 1 に記載のプライマー # 21 と # 22 を用いて PCR を行った。増幅した約 1.9 kbp の DNA を Eco RI および Xho I で処理し、pBS ベクターの Eco RI-Xho I 部位に挿入したプラスミドを pBS/cCERT(G67E)と名付けた。以下に記載するように、LY-A 細胞由来の cCERT には、67 番目のグリシン残基がグルタミン酸に置き換わるミスセンス変異が起こっていることがわかったので、このタンパク質を cCERT(G67E)と命名した。

20 <CHO-K1 細胞または LY-A 細胞に由来する CERT のカルボキシル末端への FL 配列付加方法>

抗 FLAG 抗体で認識できる FL 配列を cCERT のカルボキシル末端に付加するために、pBS/cCERT をテンプレートにし、かつ、表 1 に記載のプライマー #23 と #6 を用いて PCR を行った。この増幅産物を Cla I と Xho I とで処理して得られる約 300 bp DNA を精製した。そして、pBS/cCERT および pBS/cCERT(G67E)を Cla I と Xho I とで処理して得られる約 3.7 kbp

DNA に、先に精製した約 300 bp DNA を挿入することで、カルボキシル末端に FL 配列が付加した CERT をコードする DNA を作成し、pBS 上にクローニングした。配列を確認後、クローニングした DNA を pLIB ベクターにも移した。

5

また、cCERT および cCERT(G67E)の FL 配列付加型(それぞれ、cCERT-FL および cCERT(G67E)-FL と命名)をコードする cDNA をレトロウイルスベクターを介して、LY-A2 細胞に導入した(LY-A2+cCERT-FL)細胞及び(LY-A2+cCERT(G67E)-FL)細胞、MCD 耐性を<MCD 耐性回復株を選択する方法>に記載される方法に準じて生き残った細胞数を数えることによって測定し、LY-A2 細胞の性質が野生型に回復するか否かを解析した。結果を図 12 (A) に示す。さらに、cCERT-FL 配列及び cCERT(G67E)-FL 配列に対して、<抗 FLAG 抗体また抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロット解析方法>と同様にウェスタンブロット解析を行った。ただし、FL 配列付加 CERT タンパク質を検出する目的には抗 FLAG M2 モノクローナル抗体を用いた。結果を図 12 (B) に示す。

10
15

<GFP 融合 CERT 発現プラスミドの作成方法>

hCERT, cCERT および cCERT(G67E)のカルボキシル末端に GFP を付加した融合蛋白質を発現するためのプラスミドを以下のように作成した。

20 pBS/hCERT, pBS/cCERT または pBS/cCERT(G67E)をテンプレートにし、かつ、表 1 に記載のプライマー #3 と #24 を用いて PCR を行った。増幅した約 1.9 kbp の DNA を Eco RI および Xho I で処理し、pBS ベクターの Eco RI-Xho I 部位に挿入してクローニングした後、塩基配列を確認した。そして、これらクローニングした DNA を Eco RI と Xho I とで処理して切り出し、pEGFP-N3 ベクターの Eco RI-Sal I 部位に挿入した。このように作成した CERT-GFP 融合蛋白質発現プラスミドは、それぞれ pHCERT-GFP,

25

pcCERT-GFP, pcCERT(G67E)-GFP などと系統的に命名した。なお、プライマー #3 と #24 の塩基配列は hCERT の DNA 配列を基にして設計しており、cCERT の当該部分の DNA 配列とは部分的に異なっている。しかし、当該部分のアミノ酸配列は hCERT と cCERT との間で同一であり、かつ、これらプライマーは cCERT に対する PCR においても有効であったので使用した。

<CHO 細胞における GFP および GFP 融合 CERT の発現方法>

pEGFP-N3, phCERT-GFP, pcCERT-GFP または pcCERT(G67E)-GFP プラスミドを、フージーンを用いて、CHO-K1 細胞に導入した。得られた細胞を (CHO-K1+ pEGFP-N3) 細胞、(CHO-K1+ phCERT-GFP) 細胞、(CHO-K1+ pcCERT-GFP) 細胞、(CHO-K1+ pcCERT(G67E)-GFP) 細胞と命名した。DNA 導入開始から 24 時間培養後に播種し直し、さらに二日培養後に、蛍光観察もしくは細胞破碎液調製に供した。

< (CHO-K1+ pEGFP-N3) 細胞、(CHO-K1+ pcCERT-GFP) 細胞、(CHO-K1+ pcCERT(G67E)-GFP) 細胞に発現した GFP または GFP 融合 CERT とゴルジ体局在マーカーとの共局在解析方法 >

CERT 融合 GFP を一過的に発現した (CHO-K1+ pEGFP-N3) 細胞、(CHO-K1+ pcCERT-GFP) 細胞、(CHO-K1+ pcCERT(G67E)-GFP) 細胞において、ゴルジ体に局在する GS28 蛋白質に対する抗体を用いた間接免疫細胞染色を行い、GFP と GS28 の細胞内分布を比較した。免疫細胞化学的手法は、Yasuda ら (J. Biol. Chem. 278, 4176-4183., 2003) の方法に準じた。すなわち、カバーガラス上での培養した細胞に対して、3.7%ホルムアルデヒド固定処理、0.1M 塩化アンモニア処理、0.2%トリトン X-100 処理、ブロッキング処理、一次抗体処理と洗浄、そして二次抗体処理と洗浄を施した後、スライドガラス上へマウントし、蛍光顕微鏡観察した。ただし、一次抗体にはマウス抗 G28 モノクローナル抗体を、二次抗体にはア

レキサフルオロ 594 ヤギ抗マウス免疫グロブリン G を使用した。結果を図 1 3 (A) に示す。

＜抗 FLAG 抗体また抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロット解析方法＞

細胞破碎液の調製およびウエスタンブロットの方法は、それぞれ

- 5 Hanada ら (J. Biol. Chem. 273, 33787-33794.; 1998) の方法および Bejaoui ら (J. Clin. Invest. 110, 1301-1308., 2002) の方法に準じた。すなわち、冷却 PBS で洗浄した細胞を掻取り法によって回収し、HSEI 緩衝液[10 mM ヘベス-NaOH 緩衝液(pH 7.5)に 250 mM スクロース、1 mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、およびプロテアーゼ阻害剤カクテルを添
- 10 加したもの]に懸濁後、投げ込み式超音波発生器を用いた超音波処理によって、細胞を破碎した。この破碎液を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、PVDF 膜に転写した。この転写膜に対して、ブロッキング処理、第一次抗体処理および洗浄処理、第二次抗体処理および洗浄処理、そして ECL 処理を施し、免疫学的反応蛋白質を検出した。ただし、FL 配
- 15 列付加 CERT を検出する目的には抗 FLAG M2 モノクローナル抗体を、GFP または GFP 融合 CERT を検出する目的には BD Living Colors™ A.v.モノクローナル抗体を、それぞれ第一次抗体として用いた。第二次抗体としては HRP 結合ヤギ抗マウス免疫グロブリン G を用いた。結果を図 1 3 (B) に示す。

- 20 <ヒスチジンタグ配列が付加した hCERT タンパク質およびその関連タンパク質の大腸菌発現用ベクターの作成>

ヒスチジンタグ配列が付加した hCERT タンパク質およびその関連タンパク質を大腸菌で発現させるために、本願明細書の段落番号 0 0 6 4 ~ 0 0 6 6 で作成・クローニングした DNA 断片を pET28a(+)ベクターのマルチクローニング部位にインフレームになるように移したプラスミドを

25 作成した。すなわち、pBS ベクターにクローニングした hCERT, hCERT_L,

hCERT Δ PH, hCERT Δ MR, および hCERT Δ ST は、Eco RI-Xho I 処理で回収し、pET-28a(+)の EcoRI-Xho I 部位に挿入した。一方、pBS/nFL にクローニングした PHhCERT, MRhCERT および SThCERT は、Hind III-Xho I 処理で回収し、pET-28a(+)の Hind III-Xho I 部位に挿入した。

5 <組換え大腸菌からの hCERT の精製方法>

hCERT タンパク質およびその関連タンパク質 (hCERT タンパク質, hCERT_L タンパク質, hCERT Δ PH タンパク質, hCERT Δ MR タンパク質, および hCERT Δ ST タンパク質、並びに PHhCERT タンパク質, MRhCERT タンパク質および SThCERT タンパク質) をコードする DNA を組み込んだ

- 10 pET-28a(+)プラスミドをヒートショック法により大腸菌 BL21(DE3)株に導入し、カナマイシンに対する耐性菌として形質転換させた。形質転換細胞をルリア・ブローズ培地中、細胞濁度が波長 600 nm における吸光度で 0.6 に達するまで 37 °C で培養した。吸光度 0.6 に達した時点で、IPTG (イソプロピル-1-チオ- β -D-ガラクトピラノシド) を終濃度 250 μ M
- 15 になるように加え、更に 25 °C で一晩培養した。培養液を遠心し、沈降した大腸菌を破碎用の緩衝液 {25 mM トリス (pH 7.4)、1% トリトン X-100、1 mM オルトバナジン酸、50 mM フッ化ナトリウム、5 mM ピロリン酸ナトリウム、2.5 mM 2メルカプトエタノール、0.27 M スクロース、及びプロテアーゼ阻害剤混合物 (ロッシュ #1873580) 1 錠/50 ml} に懸濁した
- 20 のち、投げ込み式超音波発生器を用いて菌を破碎した。これを 10 万 g で 1 時間遠心し、上清画分を精製に用いた。精製にはクロンテック社の TALON (コバルトイオンキレート樹脂) を用いた。TALON による精製はマニュアルに従った。150 mM のイミダゾールで溶出した目的タンパクを一晩透析し、10 mM トリス (pH 7.4)、250 mM スクロースからなる緩衝液、
- 25 または 10 mM トリス (pH 7.4)、150 mM 塩化ナトリウムからなる緩衝液に置換したのち、-80 °C で保存した。CERT は、図 1 に示すように、アミ

ノ末端約 100 アミノ酸領域にプレクストリンホモロジー(PH)ドメインを、カルボキシル末端約 250 アミノ酸領域にステロイドジェック急性制御タンパク質関連脂質転移(steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer; START)ドメインを、それらの中間領域(middle region, MR)のドメインと大きく3つのドメインを持っていると示唆されている。そこで、各ドメインのみを欠いた、hCERT Δ PH タンパク質、hCERT Δ MR タンパク質、および hCERT Δ ST タンパク質、及び、各ドメインのみを有する PHhCERT タンパク質、MRhCERT タンパク質および SThCERT タンパク質もアミノ酸配列を解析した。さらに、hCERT の MR ドメインの最後に 26 アミノ酸が挿入された構造をしている hCERT_L タンパク質に相当する組換え体も調製し、アミノ酸配列を解析した。hCERT タンパク質の配列を配列番号 1 のアミノ酸配列として示す。各ドメインのみを欠いたタンパク質である hCERT Δ PH タンパク質、hCERT Δ MR タンパク質および hCERT Δ ST タンパク質、及び、各ドメインのみを有する PHhCERT タンパク質、MRhCERT タンパク質および SThCERT タンパク質の構造を図 1 に示されている。また、hCERT_L タンパク質の配列を配列番号 2 のアミノ酸配列として示す。以上のように、本発明の薬剤に用いるタンパク質を製造し、以下の実施例において用いた。

図 2 ~ 図 13 において以下のことが判明した。図 2 に示すように、pLIB/hCERT 由来のウイルス粒子感染によって、LY-A2 は、有意に MCD 耐性およびライセニン感受性を獲得したが、一方、pLIB ベクター由来のウイルス粒子感染では、そのような変化は全く起こらなかった。この結果から、hCERT の発現によって、LY-A2 の MCD およびライセニンに対する反応性が野生型に似た性質に変化することが示された。

図3 (A) で示すように、精製株である LY-A2/hCERT 細胞の MCD およびライセニンに対する反応性は、野生型 CHO-K1 細胞でみられる反応性とほぼ同じレベルであった。さらに、図3 (B) に示されるように、細胞の含有する各リン脂質を化学的に定量したところ、LY-A2/hCERT 細胞においては、SM 含有量も野生型レベルに回復していた。また、図4 (A) で示すように、放射性セリンを用いた脂質代謝標識実験を行うと、SM 合成速度も LY-A2/hCERT 細胞では野生型レベルに回復していた。これらの結果から、LY-A2 における SM 合成の低下は、hCERT の安定発現によってほぼ完全に野生型レベルへと回復することが明らかとなった。

10 <LY-A2 細胞における SM 合成回復は、SM 合成酵素活性や PC 合成の増進ではないことの証拠>

図4 (B) に示されるように、SM はホスファチジルコリン (PC) からセラミドへのホスホコリンの転移により合成され、該反応は SM 合成酵素により触媒される。放射性コリンを用いた脂質代謝標識実験においても、LY-A2/hCERT 細胞の SM 合成速度は野生型レベルに回復しており、また PC 合成速度も野生株レベルであった。図5 に示されるように、SM 合成酵素の活性は、LY-A2/hCERT, LY-A2, CHO-K1 細胞間で差はなかった。これらの結果から、LY-A2 細胞における SM 合成回復は、SM 合成酵素活性や PC 合成の増進によるものではないことが示された。

20 <生きた細胞における C₅-DMB-Cer の ER からゴルジ体への再分配>

図6 に示されるように、LY-A2/hCERT, LY-A2, CHO-K1 細胞は、追跡前は、本質的に同じ細胞内 DMB 蛍光のパターンを示し、それは細胞内器官膜の全体にほぼ均一に分布していた。一方、標識細胞を追跡したとき、
25 LY-A2 細胞におけるゴルジ体領域への DMB 蛍光の蓄積は CHO-K1 細胞に

比べて明らかに低かったが、LY-A2/hCERT では CHO-K1 細胞に匹敵する蓄積が観察された。

図 7 に示されるように、エネルギー阻害剤（50 mM のデオキシ-D-グルコースおよび 5 mM の NaN_3 ）処理によって細胞内 ATP を枯渇した条件下では、ER からゴルジ体領域への DMB 蛍光の移動は、CHO-K1 細胞においてと同様に LY-A2 細胞でも阻害された。これらの結果から、LY-A2 細胞で欠損している ATP 依存性の ER-ゴルジ体間セラミド輸送は、hCERT の安定発現によってほぼ完全に回復されることが明らかとなった。

図 8 に示すように、1 μM の HPA-12 は、CHO-K1 細胞においてと同様に LY-A2 細胞でも SM 合成を顕著に阻害した。(1R,3R)HPA-12 感受性輸送経路が欠損している LY-A2 細胞では、(1R,3R)HPA-12 無処理でも SM 生合成が低下しており、本薬剤処理をしてもさらなる阻害はみられなかった。これらの結果から、hCERT の導入で回復したセラミド輸送経路は (1R,3R)HPA-12 感受性経路であることが明らかとなった。

図 9 に示すように、MCD に対する反応性、SM 生合成、 C_5 -DMB-Cer の ER からゴルジ体領域への移動、それら全ての指標において、LY-A/hCERT 細胞は野生型の性質に回復していた。

図 10 (A) に示すように、hCERT よりも 26 アミノ酸残基大きな別スプライシング型産物・hCERT_L が LY-A 細胞の欠損を相補するか否かを検証した。アミノ末端に FL 配列を付加した hCERT (FL-hCERT) もしくは hCERT_L(FL-hCERT_L) を発現するためのレトロウイルスを LY-A2 細胞に感染

させた場合、有意に MCD 耐性を獲得したが、一方、空ベクター由来のウイルス粒子感染では、そのような変化は起こらなかった。図 10 (B) に示すように、FL 配列に対するウエスタンブロット解析によると、FL-hCERT と FL-hCERT_L の導入発現効率がほぼ等しかった。これらの結果から、hCERT_L は、hCERT と同様に、LY-A 細胞の欠損を相補する能力があることが明らかとなった。

<CHO-K1 細胞由来 CERT cDNA の配列解析>

CHO-K1 細胞由来 CERT mRNA に対する全長 cDNA の配列を RACE などによって決定した。全長 2473 bp の配列は、598 アミノ酸の産物(cCERT)をコードする 1794 bp の ORF を含んでいた (配列表 3 および 7)。CERT は、ヒト、マウス、およびチャイニーズハムスターの全てで 598 アミノ酸であり、また、cCERT と hCERT との間には、DNA 配列レベルで約 90%、アミノ酸レベルで約 98% の同一性があった。この結果は、CERT の哺乳動物間での強い保存性を示している。また、CHO 細胞由来の cDNA ライブラリーから、hCERT_L の相同タンパク質(cCERT_L と命名)をコードする ORF も PCR で増幅された (配列表 4 および 8)。hCERT_L と hCERT との関係に同じく、cCERT_L は cCERT よりも 26 アミノ酸大きな産物である。

<CHO 細胞 CERT のノザンブロット解析>

図 11 に示すように、CHO-K1 細胞と LY-A 細胞の間に CERT mRNA 発現に差があるか否かを調べる目的で、ノザンブロット解析を行った。CERT プローブにハイブリダイズする 3 つの異なる分子量(それぞれ、約 1.2, 2.6, 5.5 キロ塩基)RNA が検出され、いずれの発現レベルも CHO-K1 細胞と LY-A 細胞の間に有意の差はなかった。CHO-K1 細胞からクローニングした CERT 全長 cDNA は 2473 bp であったので、ノザンブロット解析で検出された約 2.6 キロ塩基)RNA がおそらく CERT 全長 cDNA に対応する mRNA

であると考えられる。他の 1.2 および 5.5 キロ塩基 RNA は、スプライス
アイソフォームまたは未成熟型 CERT mRNA であるのかもしれない。内部
対照を得る目的で、 β アクチン DNA をプローブとして用いた再ハイブリ
ダイズを行い、アクチン mRNA レベルが両細胞 RNA サンプル間で等しいこ
5 とも確認した。

<LY-A 細胞由来 CERT cDNA の配列解析>

前節で示したように、LY-A 細胞においても CERT mRNA が発現している
ことを見出した。そこで、逆転写 PCR によって、LY-A 細胞から CERT cDNA
をクローニングした。LY-A 細胞の CERT cDNA は、CHO-K1 細胞由来配列と
10 比較した場合、唯一の変異を有していることが明らかとなった。この変
異は、ORF の 6 7 番目のコドンが GGA から GAA に変わる一塩基置換であ
り、結果として cCERT タンパク質の 6 7 番目のグリシン残基がグルタミ
ン酸残基へと置換するミスセンス変異であった。そこで、この ORF 産物
を cCERT(G67E)と命名した。なお、本実験において、PCR は独立に 2 回行
15 い、同一の配列を得た。よって、先述したミスセンス変異は PCR による
人工的な変異ではない。

<LY-A2 細胞における cCERT もしくは cCERT(G67E)の cDNA 導入発現効果 >

図 1 2 (A) に示すように、LY-A2 に cCERT-FL cDNA を導入した場合、
20 明らかな MCD 耐性回復が起こったが、それらの G67E 変異型を導入した場
合は、そのような回復は起こらなかった。FL 配列を付加していない cCERT
および cCERT(G67E)の cDNA を導入した場合でも同様な結果が得られた
(データ未表示)。また、図 1 2 (B) に示すように、FL 配列に対する
ウエスタンブロット解析における、cCERT-FL と cCERT(G67E)-FL の発現
25 レベルがほぼ等しいことが示された。よって、cCERT(G67E)発現レベルが
cCERT 発現レベルに比べて低いために機能回復能が低いという可能性は

否定された。これらの結果から、LY-A 細胞の欠損は、野生型 cCERT の発現により相補されること、cCERT の当該相補機能は G67E 変異によって損なわれることが明らかとなった。

- 5 なお、図 10 (B) および図 12 (B) に示したウエスタンブロット解析結果において、CERT が二重バンドとして観察されるのは、本蛋白質のリン酸化のためと考えられる。実際、脱リン酸化処理を行うと二重バンドのうち高分子量のほうのバンドは消失した。

＜CERT の細胞内分布に対する G67E 変異の影響＞

- 10 図 13 (A) に示されるように、cCERT-GFP を発現させた場合、これらの緑色蛍光は細胞質にも分布するが、核周辺領域に明らかに濃縮していた。この核周辺領域は、GS28 局在領域と一致していることから、ゴルジ体であると考えられる。一方、cCERT(G67E)-GFP を発現させた場合、その緑色蛍光の分布は、細胞質にほぼ均一に分布し、GS28 局在領域へ選
- 15 択的に濃縮しなかった。また、CERT と融合していない GFP を発現させた場合、細胞質だけでなく核にも多く分布した。なお、図 13 (B) に示される抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロット解析から、cCERT-GFP や cCERT(G67E)-GFP は予想された分子量の産物として発現され、GFP 抗体に交差する分解産物は検出されなかった。よって、これら GFP 融合タンパ
- 20 ク質発現時に観察された GFP 蛍光分布は、cCERT-GFP もしくは cCERT(G67E)-GFP そのものの分布を反映している。これらの結果から、CERT は、細胞質とゴルジ体に主に分布すること、CERT のゴルジ体会合能は G67E 変異で損なわれること、G67E 変異は CERT が核から除外される性質には影響しないこと、が明らかとなった。

LY-A株に hCERT cDNA を導入すると SM 合成が野生株レベルに回復した。また、蛍光性セラミド類似体を用いたアッセイによって、小胞体からゴルジ体へのセラミド移動が回復することも明らかとなった。別スプライシング型に相当する hCERT_L cDNA も LY-A 株を回復させた。よって CERT

5 タンパク質は、細胞内セラミド選別輸送に関わる因子である。

以上の結果から、(1) CERT タンパク質は、セラミド輸送に欠損を持つ LY-A 細胞の機能回復探索法で cDNA ライブラリーから選択されてきたこと、(2) CERT タンパク質は、LY-A 細胞の知られている限り全ての欠

10 損を相補すること、(3) LY-A 細胞では自身の CERT タンパク質をコードする遺伝子にミスセンス変異が起こっていること、(4) LY-A 細胞で起こっている変異を持つ CERT タンパク質は、LY-A 細胞の欠損相補能を損なっていることを明示している。従って、これらの結果から、当該 CERT

15 タンパク質をコードする遺伝子における変異が LY-A 細胞の欠損の原因変異であること、および、CERT が細胞内セラミド選別輸送に特異的に関わる因子であることが初めて明らかとなった。

実施例 1

＜hCERT タンパク質、hCERT_L タンパク質及びその組換えタンパク質＞

20 次に、hCERT タンパク質及びその組換えタンパク質(hCERT タンパク質、hCERT_L タンパク質、hCERT△PH タンパク質、hCERT△MR タンパク質、および hCERT△ST タンパク質、並びに PHhCERT タンパク質、MRhCERT タンパク質および SThCERT タンパク質) が脂質膜からセラミドを遊離させる活性を示すか否かを検討した。このアッセイには、＜ヒスチジントグ配列

25 が付加した hCERT タンパク質およびその関連タンパク質の大腸菌発現用ベクターの作成＞及び＜組換え大腸菌からの hCERT の精製方法＞におい

て、上記したように大腸菌で発現させた CERT タンパク質及びその組換えタンパク質 (hCERT タンパク質, hCERT_L タンパク質, hCERT Δ PH タンパク質, hCERT Δ MR タンパク質, hCERT Δ ST タンパク質、並びに PHhCERT タンパク質, MRhCERT タンパク質および SThCERT タンパク質) を精製して使用した。

<膜からのセラミド遊離促進活性の検出方法>

以下に標準的な方法の詳細を記載するが、記載した条件を変更しても、原理的に遊離セラミドを遠心法で分離する手段を有するセラミド遊離促進活性の検出方法は、本発明に属する。セラミド含有脂質膜は、卵黄由来のホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンの 4 : 1 からなる混合脂質をベースとして、1 サンプル当たり 12.5 nCi (225 pmol) の [パルミトイル-1-¹⁴C] N-パルミトイル-D-エリスロ-スフィンゴシン (以下 ¹⁴C-セラミドと述べることもある) を含み、濃度が 2.5 mg/mL になるように調製した。この脂質膜が活性測定 1 サンプル当たり 20 μ L 必要である。活性測定に必要な量の脂質をエッペンドルフチューブに分取したのち、窒素を吹き付けて乾固させた。乾固した脂質膜に濃度が 2.5 mg/mL になるように、緩衝液 1 [50 mM NaCl および 1 mM EDTA を添加した 20 mM ヘペス-NaOH 緩衝液 (pH 7.4)] を加えた後、浴槽型超音波発生器 [ブランソン (Branson) 社製モデル 2210] を用いて穏やかに超音波処理した。超音波処理は 25 $^{\circ}$ C で行い、3 分間の超音波処理、30 秒間のボルテックス、3 分間の超音波処理、という手順で行った。このようにして調製した脂質膜をセラミド遊離実験に用いた。脂質膜からのセラミドの遊離反応とその検出は以下のように行った。

対象とするタンパク質試料として上記した hCERT タンパク質又はその組換えタンパク質それぞれ (標準条件では、供与膜中セラミドの 2 倍モ

ル等量に当たる 450 ピコモル相当のタンパク質を使用)を、緩衝液 2
[100 mM NaCl および 0.5 mM EDTA を添加した 50 mM ヘベス-NaOH 緩衝液
(pH 7.4)]を用いて 30 μ L にメスアップした。ここにセラミド含有脂質
膜を 20 μ L 加えて反応を開始した。最終的なリン脂質の濃度は 1 mg/mL
5 になり、セラミドは全リン脂質量に比して約 0.3%含まれている。これら
の混合物を 37°C で 30 分間保温した後、50,000 x g で 30 分間遠心し
(遠心機、日立工機社製 himac CS120EX; 遠心ロータ, RP100AT3-200; 遠
心チューブ, 0.23PC チューブ)、脂質膜を沈降させた。組み換え大腸菌
から精製してきた hCERT タンパク質及び組換えタンパク質を用いた場合、
10 この遠心条件では大部分のタンパク質が上清に残るので、 14 C-セラミド
が hCERT タンパク質に結合すると、脂質膜から遊離して上清画分に移行
する。上清画分の 14 C の放射活性を液体シンチレーションカウンターで
測定することにより、hCERT によるセラミドの遊離を促進する活性を算
出した。hCERT タンパク質を用いたセラミドの遊離を促進する活性の測
15 定結果を図 14 (A) 及び (B) に示す。膜小胞からの遊離反応アッセ
イにおける基質をセラミドから様々な他の脂質に変えて、反応の特異性
を調べた。この際、hCERT と START ドメイン欠失 hCERT との差を、START
ドメインを介する脂質引き抜き活性の指標とした。結果を図 15 に示す。
さらに、hCERT タンパク質、hCERT_L タンパク質、hCERT Δ PH タンパク質、
20 hCERT Δ MR タンパク質、および hCERT Δ ST タンパク質、並びに PHhCERT
タンパク質、MRhCERT タンパク質および SThCERT タンパク質によるセラ
ミドの遊離活性の測定結果を図 16 に示す。

精製した組換え体 hCERT を用いて、セラミドの遊離促進活性を測定し
25 た。微量のセラミドを含んだリン脂質多重膜小胞を遠心すると、セラミ
ドはほぼ完全にリン脂質小胞とともに沈殿した。しかし、hCERT が共存

する場合には、リン脂質多重膜小胞は完全に沈殿しながらも、セラミドは膜から遊離して hCERT とともに上清み画分に分配するようになった。すなわち、図 14 (A) 及び (B) からわかる通り、hCERT の量及び保温時間の長さに依存して、リン脂質膜からのセラミドの遊離が検出された。一方、hCERT を加えない場合のセラミドの遊離はほぼゼロであった。これらの結果から、hCERT は、膜からのセラミド遊離を促進する活性を持つことが明らかになった。

現在までに、CERT 以外で START ドメインを持つタンパク質が認識する脂質としては、ホスファチジルコリンやコレステロールが知られている。しかし、図 15 に示されるように、CERT タンパク質は、ジアシルグリセロール、コレステロール、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、スフィンゴシンに対して有意の遊離反応を示さなかった。また、セラミドと構造的に類似しているジアシルグリセロールの遊離促進は、セラミドに対する活性の 5 % 程度であった。この結果から、CERT は、特異的にセラミドを膜から遊離させる活性を持つことが明らかになった。

図 16 に示されるように、hCERT の各種欠失変異体を組換え体として作成・精製し、各ドメインのもつセラミド遊離促進活性について検討した。また、hCERT_L も hCERT と同様の活性を示した。PH ドメインの欠失はセラミドの遊離促進活性に影響を与えず、MR ドメインの欠失は若干活性を低下させた。一方、このセラミド遊離反応は、hCERT タンパク質から START ドメインを欠失すると起こらなくなり、一方、START ドメインのみの SThCERT タンパク質でも活性を示した。なお、hCERT_L は、hCERT 同様のセラミド遊離促進活性を示した。この結果から、hCERT による膜からのセラミドの遊離は START ドメインを介して起こっていることが明らか

になった。以上の結果から、CERT および CERT_L は、それらの START ドメインを介して特異的にセラミドを脂質膜から遊離させる活性を持つことが明らかとなった。

- 5 以上の結果から、CERT および CERT_L は、それらの START ドメインを介して特異的にセラミドを脂質膜から遊離させる活性を持つことが明らかとなった。

実施例 2

10 <セラミドの膜間移動促進活性の測定方法>

- ついで、以下に詳細に記載するように、セラミドの脂質膜の間の移動を hCERT タンパク質及び組換えタンパク質が促進するか否かを検討し、このアッセイにも精製した hCERT タンパク質及び組換えタンパク質を使用した。本法は、すでに報告されているホスファチジルイノシトール輸
- 15 送タンパク質によるホスファチジルイノシトールの膜間移動促進活性の測定法 Kasper ら (Biochim. Biophys. Acta 664, 22-32., 1981) の原理に基づき、新たにセラミドの膜間移動促進活性測定法となるように構築したものである。膜間移動促進活性を測定するために、放射性セラミドを含有した供与膜と、セラミドを含まない受容膜とを調製する。脂質
- 20 膜の分離のために、供与膜にはラクトシルセラミドが含まれている。供与膜と受容膜を対象とするタンパク質試料とともに保温したのち、ヒマ豆レクチンを加える。低速遠心で沈降しなかった受容膜の放射活性を測定することにより膜間移動したセラミドを定量することができる。以下に標準的な方法の詳細を記載するが、記載した条件を変更しても、原理
- 25 的に選択的な認識マーカーをセラミド供与膜または受容膜のいずれかに

導入し、そのマーカを利用してセラミド供与膜と受容膜を分離する手段を有する膜間移動促進活性検出方法は、全て本発明に属する。

供与膜は、卵黄由来ホスファチジルコリン／ホスファチジルエタノールアミン／ラクトシルセラミド／セラミド＝64／16／8／1からなる混合脂質の中に、1サンプル当たり12.5 nCiの ^{14}C -セラミドと12.5 nCiの[2-パルミトイル-9,10- $^3\text{H}(\text{N})$] L- α -ジパルミトイルホスファチジルコリン(以下 ^3H -DPPCと述べることもある)を加え、総脂質濃度が1.77 mg/mLになるように調製した。セラミドは ^{14}C -セラミドに非放射性セラミドを加えて目的の物質にした。この脂質膜が活性測定1サンプル当たり20 μL 必要である。活性測定に必要な量の脂質をポリプロピレンマイクロチューブに分取したのち、窒素を吹き付けて乾固させた。乾固した脂質膜に濃度が1.77 mg/mLになるように、緩衝液1 [50 mM NaCl および1 mM EDTA を添加した20 mM ヘベス-NaOH 緩衝液(pH 7.4)]を加えた後、投げ込み式超音波発生器(例えば、クボタ社製UP50H)を用いて超音波処理した。超音波処理は25 $^{\circ}\text{C}$ の水浴上で10分間行った。このように調製した供与膜を4 $^{\circ}\text{C}$ 、12,000 x g、30分間の条件で遠心しても(遠心機、トミー社製MRX-150; 遠心チューブ、エッペンドルフ社製1.5-ml マイクロテストチューブ)、脂質膜の90%以上は沈降せずに上清に回収される。

上清に残っている脂質膜と遠心前の脂質膜を液体シンチレーションカウンターで測定し、実験毎に両者の間で ^3H の放射活性がほとんど変わらないことを確認した(通常90%以上が上清に回収された)。また、 ^3H の放射活性で求めた沈降／非沈降の比は、リン酸定量によって算出した

値とほぼ同一の値を示し、供与膜に添加した ^3H -DPPC の分配から供与膜全体の分配を推測することが可能であることを確認した。

受容膜は、卵黄由来ホスファチジルコリン／ホスファチジルエタノールアミン = 4 / 1 からなる混合脂質であり、総脂質濃度が 5.33 mg/mL になるように調製した。この脂質膜が活性測定 1 サンプル当たり 60 μL 必要である。活性測定に必要な量の脂質を 1.5-ml マイクロテストチューブ（エッペンドルフ社製）に分取したのち、窒素を吹き付けて乾固させた。乾固した脂質膜に濃度が 5.33 mg/mL になるように、緩衝液 1 を加えた後、投げ込み式超音波発生器（例えば、クボタ社製 UP50H）を用いて超音波処理した。超音波処理、及びそのあとの遠心条件等は、供与膜の調製と同様に行った。

セラミドの膜間移動を促進する活性の検出は以下のように行った。

1.5-ml マイクロテストチューブ（エッペンドルフ社製）中において、対象とするタンパク質試料である hCERT タンパク質、hCERT_L タンパク質、hCERT Δ PH タンパク質、hCERT Δ MR タンパク質、又は hCERT Δ ST タンパク質、あるいは PHhCERT タンパク質、MRhCERT タンパク質又は SThCERT タンパク質と（標準条件では、供与膜中セラミドの 0.4%モル等量に当たる 2 ピコモル相当のタンパク質を使用）と 60 μL の受容膜を、緩衝液 1 を用いて 80 μL にメスアップした。ここに 20 μL の供与膜を加えて反応を開始し、37 °C で 15 分間保温した。反応は 2.5 mg/ml のヒマ豆レクチンを 30 μL 加え、ピペッティングにより攪拌することによって終了させた。凝集体を十分に形成させるため、氷浴上でさらに 15 分間保冷したのち、4 °C、12,000 x g、3 分間の条件で遠心した。上清をピペットで採取し、沈降した供与膜は 130 μL の 0.1 % SDS にて溶かした。液体

シンチレーションカウンター（アロカ社製 LSC-5100； ^3H 放射能と ^{14}C 放射能との選別測定プログラムを使用）で、上清と供与膜の ^{14}C の放射活性を測定することにより、試料がもつセラミドの膜間移動促進活性を測定した。試料を全く含まない場合でも、セラミドはごくわずかに膜間移動するので、これを自由拡散によるバックグラウンドとして差し引いた。供与膜に添加した ^3H -DPPC に由来する放射活性の大部分（通常 90 % 以上）が供与膜とともに沈降していることを確認することで、供与膜と受容膜が選択的に分離されていることを実験毎に確認した。精製した組換え体 hCERT を用いて、セラミドの膜間移動を促進する活性を測定した結果を図 17（A）、（B）及び（C）に示す。さらに、hCERT タンパク質、hCERT_L タンパク質、hCERT Δ PH タンパク質、hCERT Δ MR タンパク質、および hCERT Δ ST タンパク質、並びに PHhCERT タンパク質、MRhCERT タンパク質および SThCERT タンパク質によるセラミドの膜間移動を促進する活性の測定結果を図 18 に示す。

15 <タンパク質の定量法>

ピアース(Pierce)社の BCA アッセイ試薬を用いて、タンパク質を定量した。標準には、BSA を用いた。

図 17（A）、（B）及び（C）に示されるように、hCERT の量、保温時間の長さ、及び保温温度に依存して、膜間のセラミドの移動が検出された。一方、hCERT を加えない場合のセラミドの膜間移動はほぼゼロであった。微量の放射性セラミドを含んだセラミド供与膜小胞とセラミドを含まない受容膜小胞とを混ぜて保温した場合、それだけではセラミドは受容膜小胞に 1 時間たっても全く移行しなかった。ところが、hCERT が共存すると、セラミド移行が起こった。添加した CERT 量によっては 10 分間で 50 % 近いセラミドが受容膜小胞に移行した。なお、ここで用

いた実験条件では、供与膜小胞と受容膜小胞の融合は hCERT の有無にかかわらず起こらなかった。これらの結果から、hCERT は、膜間セラミド移動を促進する活性を持つことが明らかになった。

- 5 図 1 8 に示すように、hCERT の各種欠失変異体を組換え体を用いて、各ドメインのもつ膜間のセラミド移動促進活性について検討した。PH ドメインの欠失は膜間セラミド移動促進活性に影響を与えず、MR ドメインの欠失は若干活性を低下させた。一方、START ドメインを欠失すると活性は完全に消失した。さらに、START ドメインのみでも高い活性が検出
- 10 されたが、他のドメインのみでは全く活性が検出されなかった。なお、hCERT_L タンパク質は、hCERT タンパク質同様の活性を示した。よって、膜からのセラミド遊離促進と同様に、hCERT による膜間セラミド移動促進は START ドメインを介して起こっていることが明らかになった。

15 産業上の利用可能性

- 本発明は、セラミド輸送を促進する新規な薬剤を提供することができる。また、本発明は、本発明の薬剤を生産するために用いられる塩基配列を提供することができる。また、本発明は、新規なセラミド遊離を促進する活性の測定方法を提供することができる。さらに、本発明は、新規なセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法を提供することができる。
- 20 ける。

配列表フリーテキスト

- 配列番号 1 ～ 4 は、それぞれ、hCERT タンパク質のアミノ酸配列、
- 25 hCERT_L タンパク質のアミノ酸配列、cCERT タンパク質のアミノ酸配列、cCERT_L タンパク質のアミノ酸配列を示す。配列番号 5 ～ 8 は、それぞれ、

hCERT mRNA の ORF の配列、hCERT_L mRNA の ORF の配列、cCERT mRNA の全長 cDNA 配列、及び cCERT_L ORF の DNA 配列を示す。配列番号 9 ～ 32 は、プライマーの配列を示す。

請求の範囲

1. 配列番号1のアミノ酸配列を有するhCERTタンパク質、配列番号2のアミノ酸配列を有するhCERT_Lタンパク質、配列番号3のアミノ酸配列を有するcCERTタンパク質、配列番号4のアミノ酸配列を有するcCERT_Lタンパク質、又はそれらの組換えタンパク質を有効成分として含有するセラミド輸送を促進する薬剤。
2. 制ガン剤、抗炎症剤、器官再生剤、抗感染症剤、又は化粧品用の分配促進剤として用いられる薬剤であることを特徴とする請求項1に記載される薬剤。
3. セラミド輸送を阻害する薬剤の検出に用いられることを特徴とする請求項1に記載される薬剤。
4. 配列番号1または3のアミノ酸配列の第370残基～第598残基、あるいは配列番号2又は4のアミノ酸配列の第397残基～第624残基からなる組換えタンパク質を有効成分とすることを特徴とする請求項1のセラミド輸送を促進する薬剤。
5. 請求項1に記載される薬剤を生産するために用いられることを特徴とする配列番号5、6、7または8の塩基配列、又はその組換え塩基配列。
6. 配列番号5の塩基配列の第1108塩基対～第1794塩基対、配列番号6の塩基配列の第1189塩基対～第1872塩基対、配列番号7の塩基配列の第1539塩基対～第2225塩基対、又は配列番号8の塩基配列の第1189塩基対～第1872塩基対からなる組換え塩基配列であることを特徴とする請求項5に記載の塩基配列。
7. セラミドを含有する脂質膜とセラミド遊離を促進する薬剤とを混合して得られた混合物を保温する保温工程を行い、遠心法で分離するこ

とにより保温した後の混合物から上清を得る分離工程を行い、次いで、得られた上清に含有されるセラミドを定量する定量工程を行うことを特徴とするセラミド遊離を促進する活性の測定方法。

5 8. 前記セラミドを含有する脂質膜が、ホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンの混合脂質にセラミドを添加して調製されたものであることを特徴とする請求項7に記載されるセラミド遊離を促進する活性の測定方法。

10 9. 前記セラミドを含有する脂質膜が、超音波処理されたものであることを特徴とする請求項7又は8に記載されるセラミド遊離を促進する活性の測定方法。

10 10. 前記セラミドを含有する脂質膜に添加されるセラミドが、放射性標識されたセラミドであることを特徴とする請求項7に記載されるセラミド遊離を促進する活性の測定方法。

15 11. 受容膜とセラミド輸送を促進する薬剤とセラミドを含有する供与膜とを混合し、得られた混合物を保温する保温工程を行い、保温工程で得られた混合物に選択的膜凝集剤を添加後、遠心法に供して受容膜と供与膜を分離する分離工程を行い、分離した受容膜及び供与膜がそれぞれ含有するセラミドを定量する定量工程を行うことを特徴とするセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法。

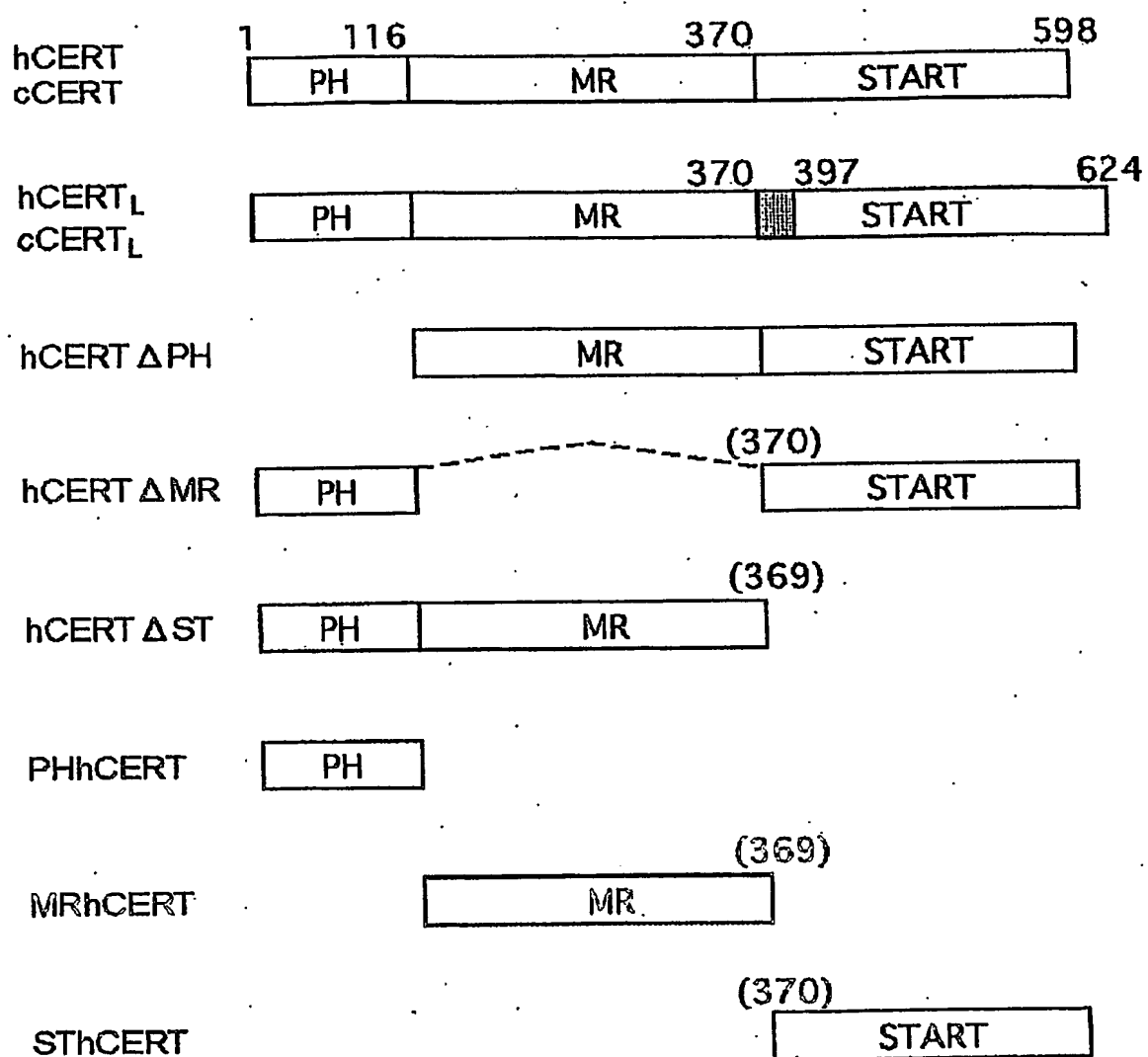
20 12. 前記受容膜が、ホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンの混合脂質で調製されたものであることを特徴とする請求項11に記載されるセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法。

25 13. 前記セラミドを含有する供与膜が、ホスファチジルコリンと、ホスファチジルエタノールと、ラクトシルセラミドと、セラミドとを含有する混合脂質から調製されることを特徴とする請求項11又は12に記載されるセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法。

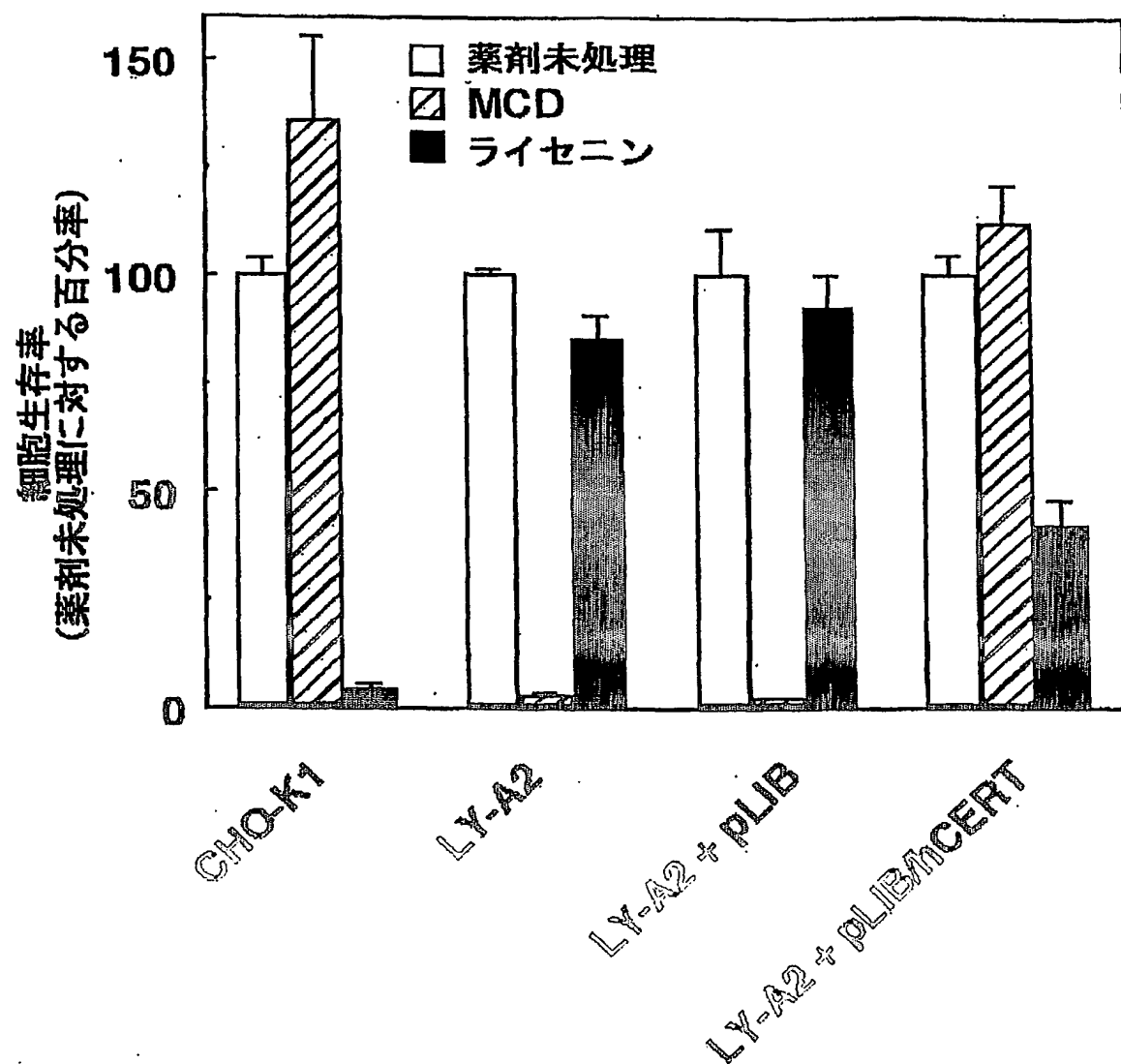
14. 前記セラミドを含有する供与膜に添加されるセラミドが、放射性標識されたセラミドであることを特徴とする請求項11に記載されるセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法。

15. 前記選択的膜凝集剤がヒマ豆レクチンであることを特徴とする
- 5 請求項10～14のいずれか1項に記載されるセラミドの膜間移動を促進する活性の測定方法。

第 1 図

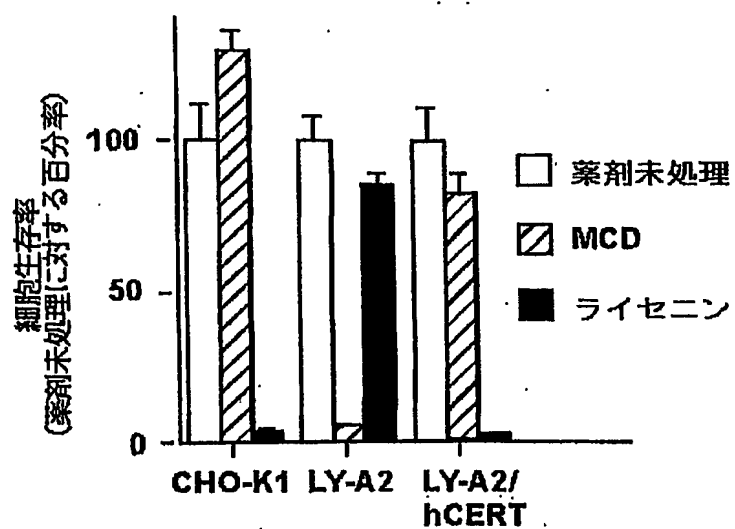


第 2 図

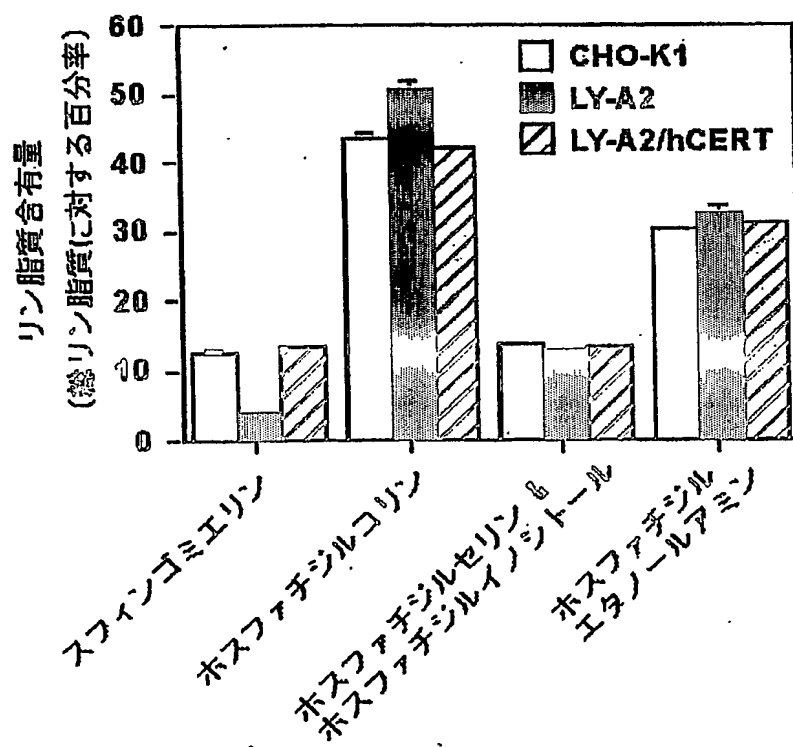


第 8 図

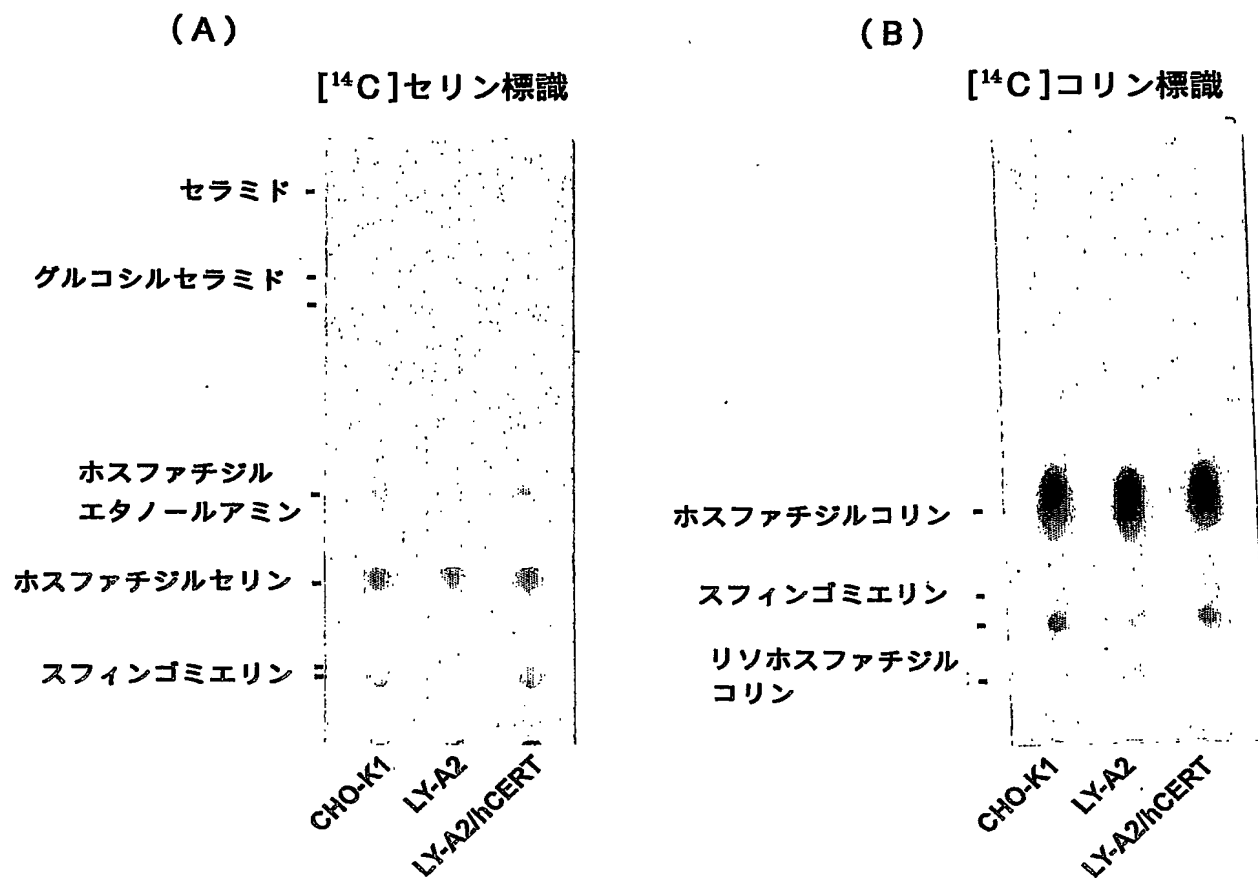
(A)



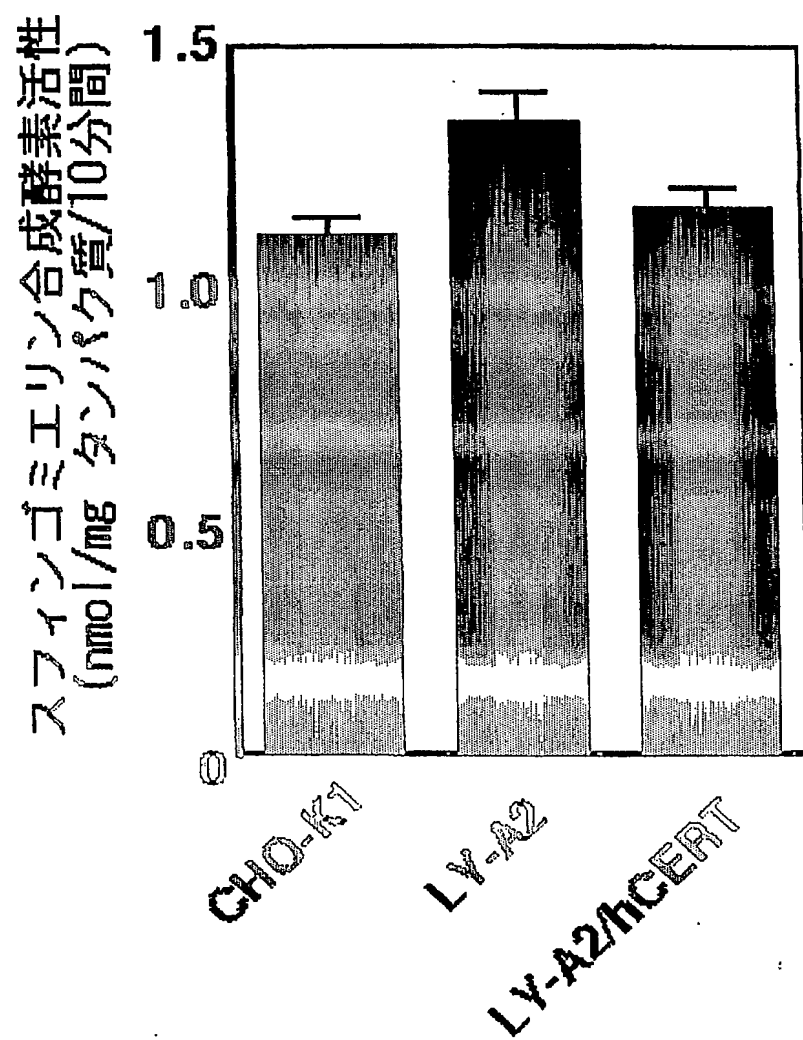
(B)



第 4 図

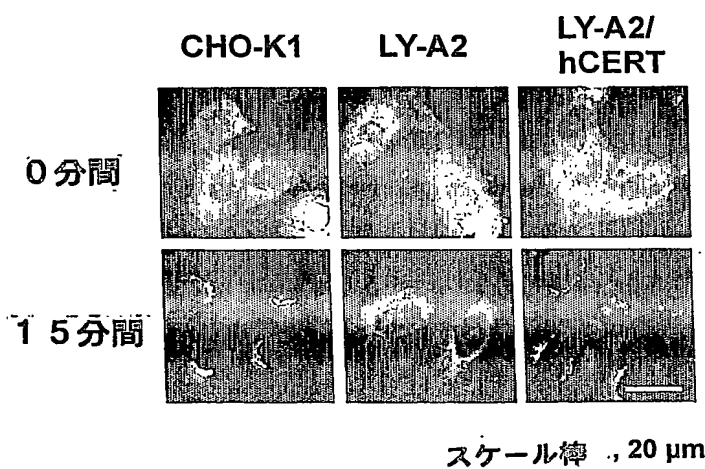


第 8 図



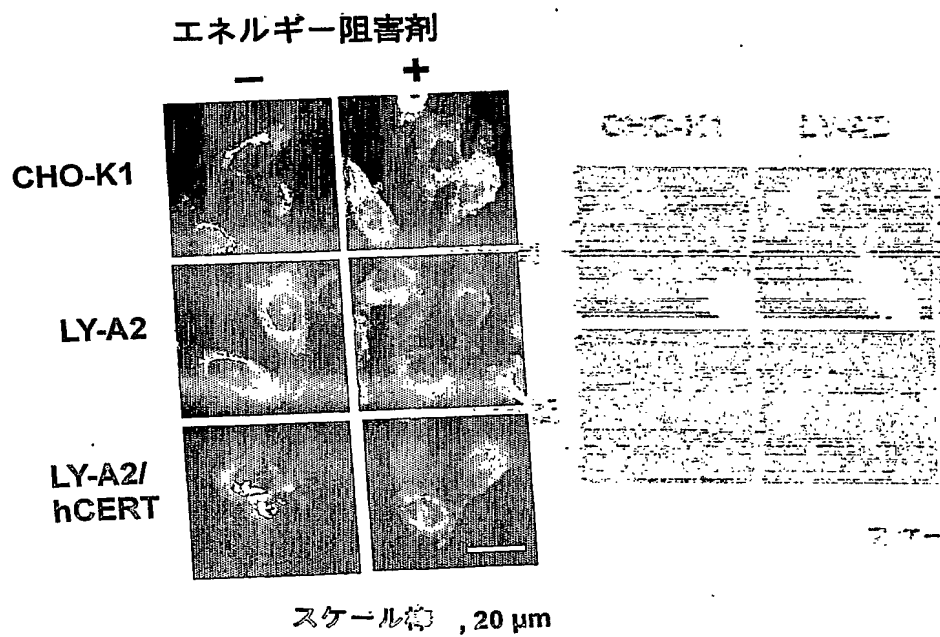
第 図

BEST AVAILABLE COPY

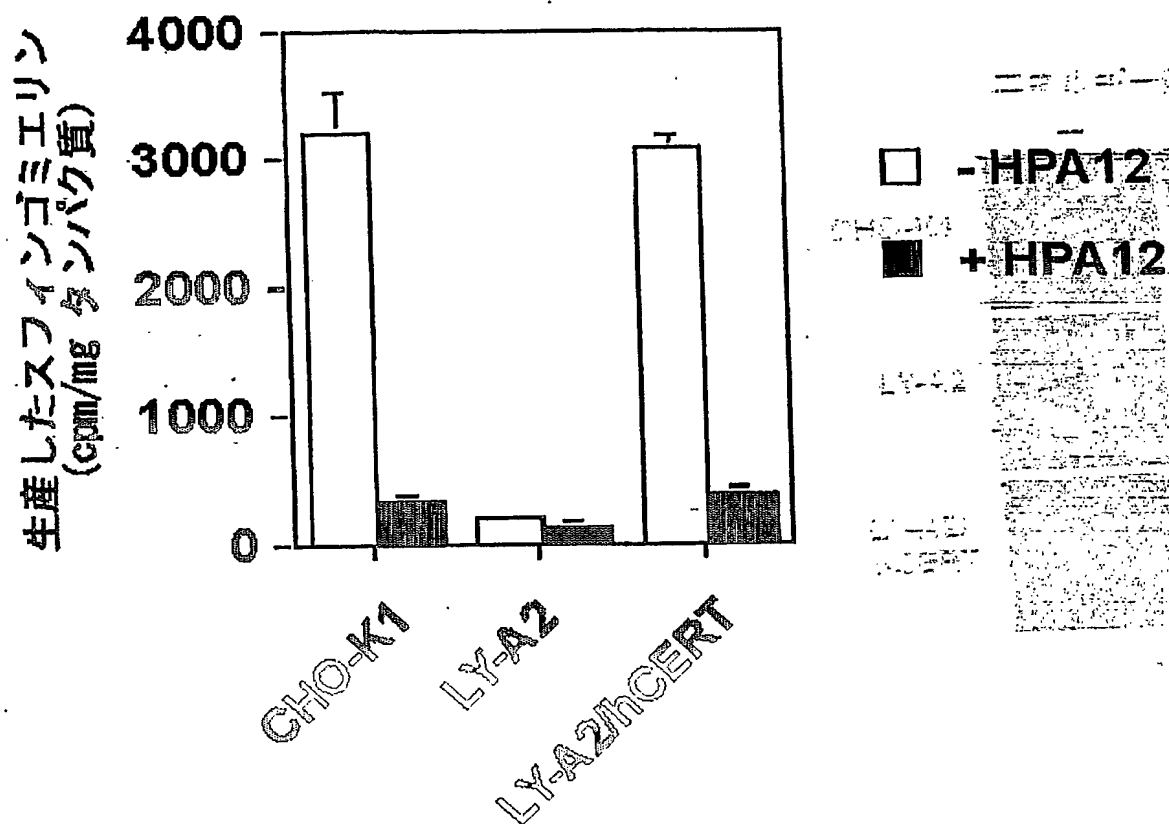


BEST AVAILABLE COPY

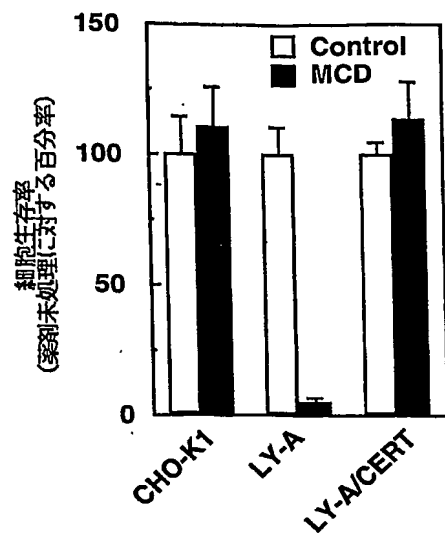
第 7 図



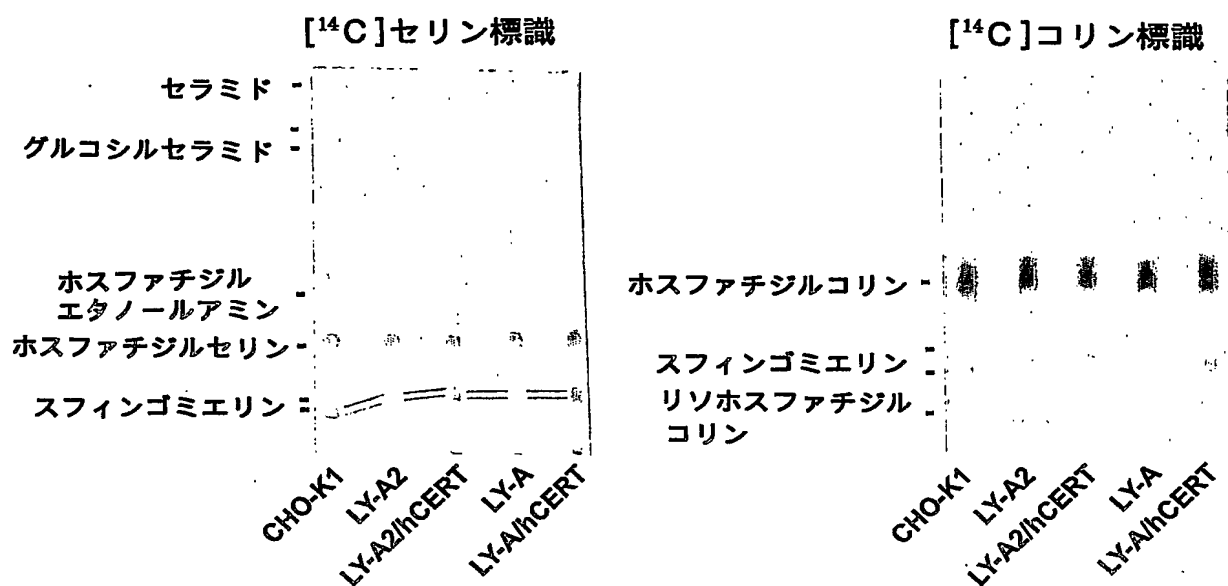
第 8 図



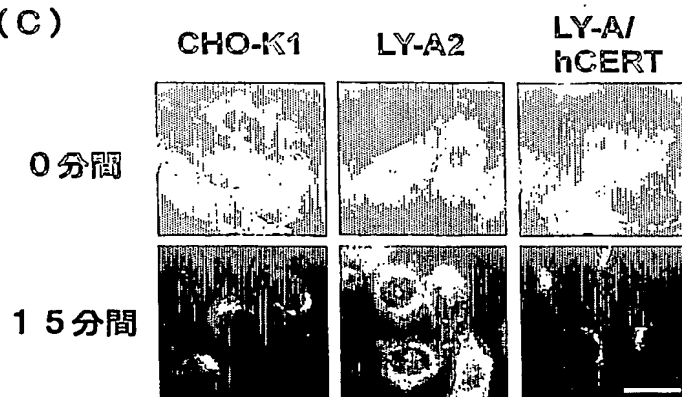
第 9 図 (A)



(B)

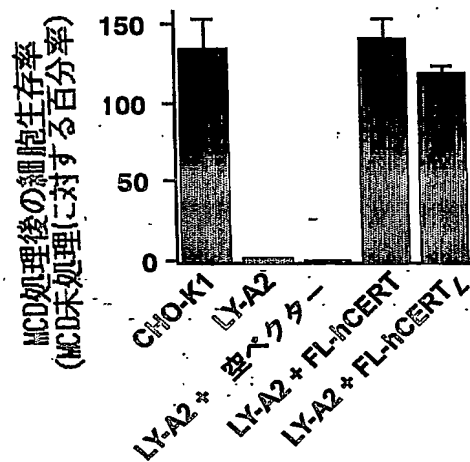


(C)

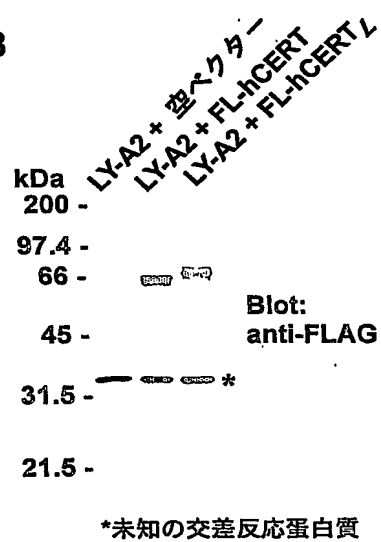
スケール棒, 20 μm

第 10 図

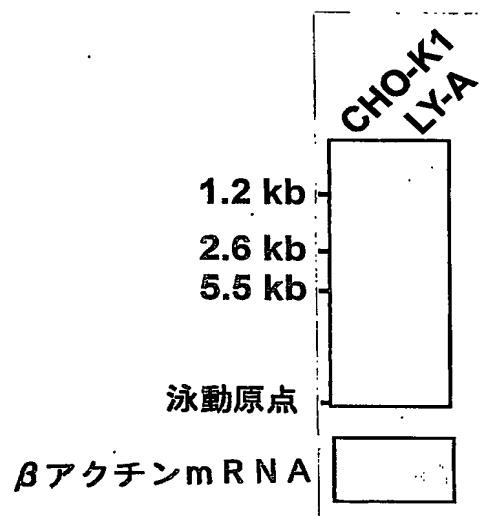
A



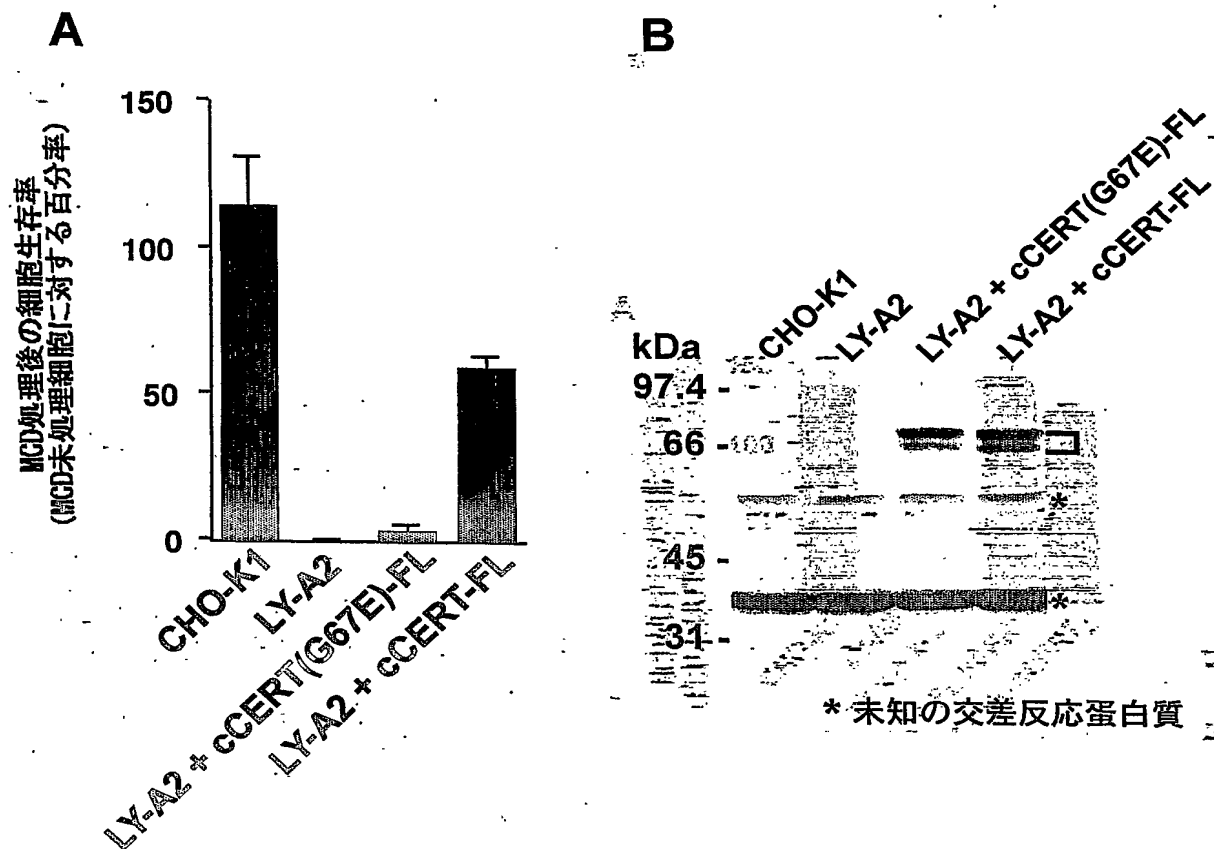
B



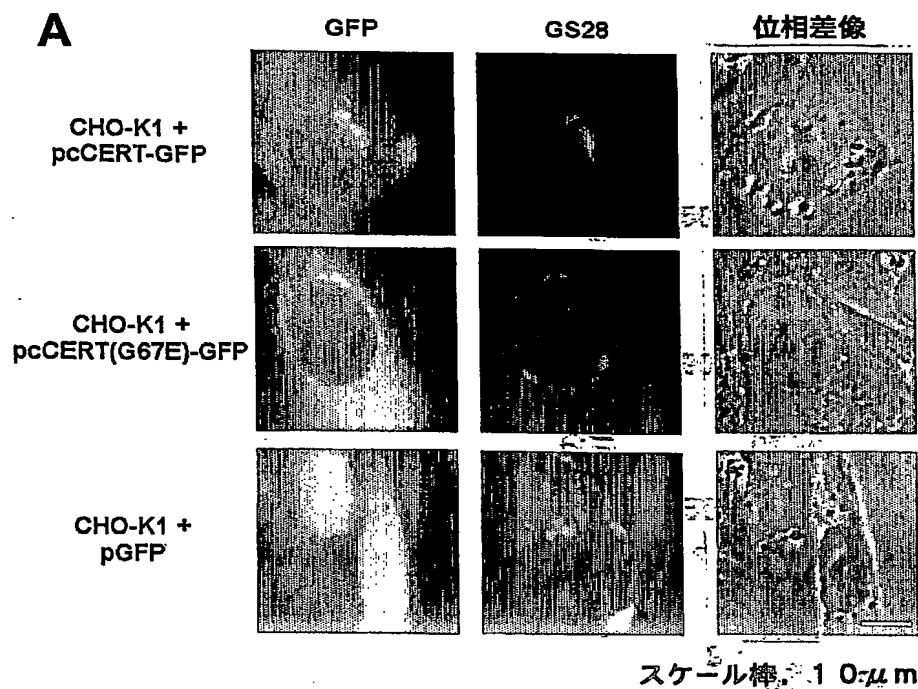
第 2 図



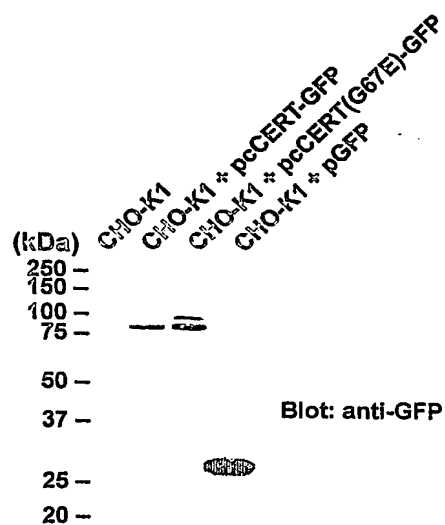
第 12 図



第 18 図



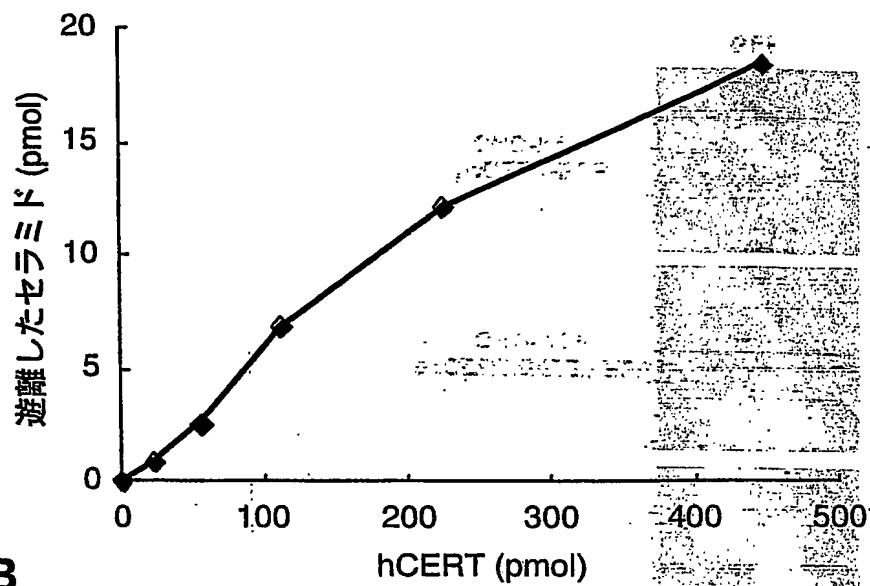
B



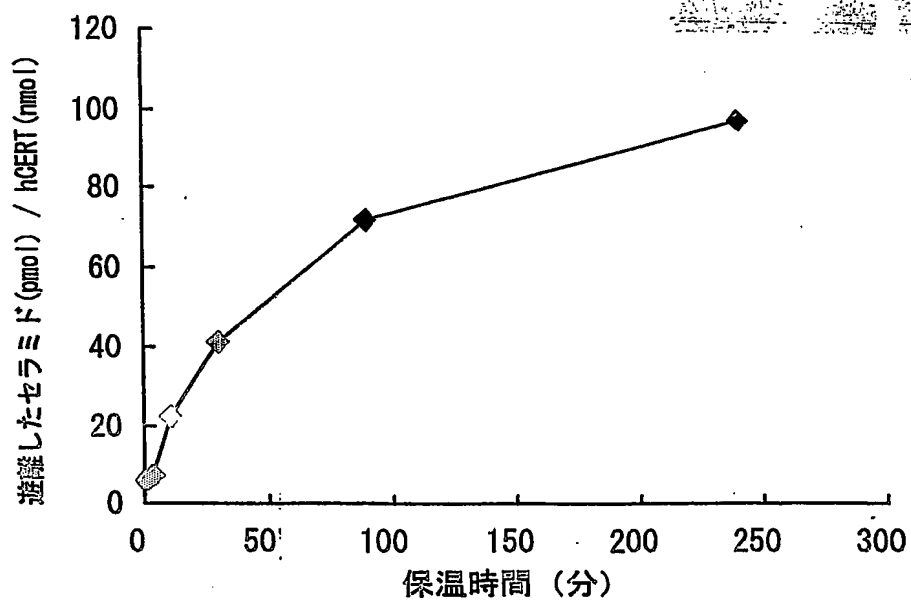
BEST AVAILABLE COPY

第14図

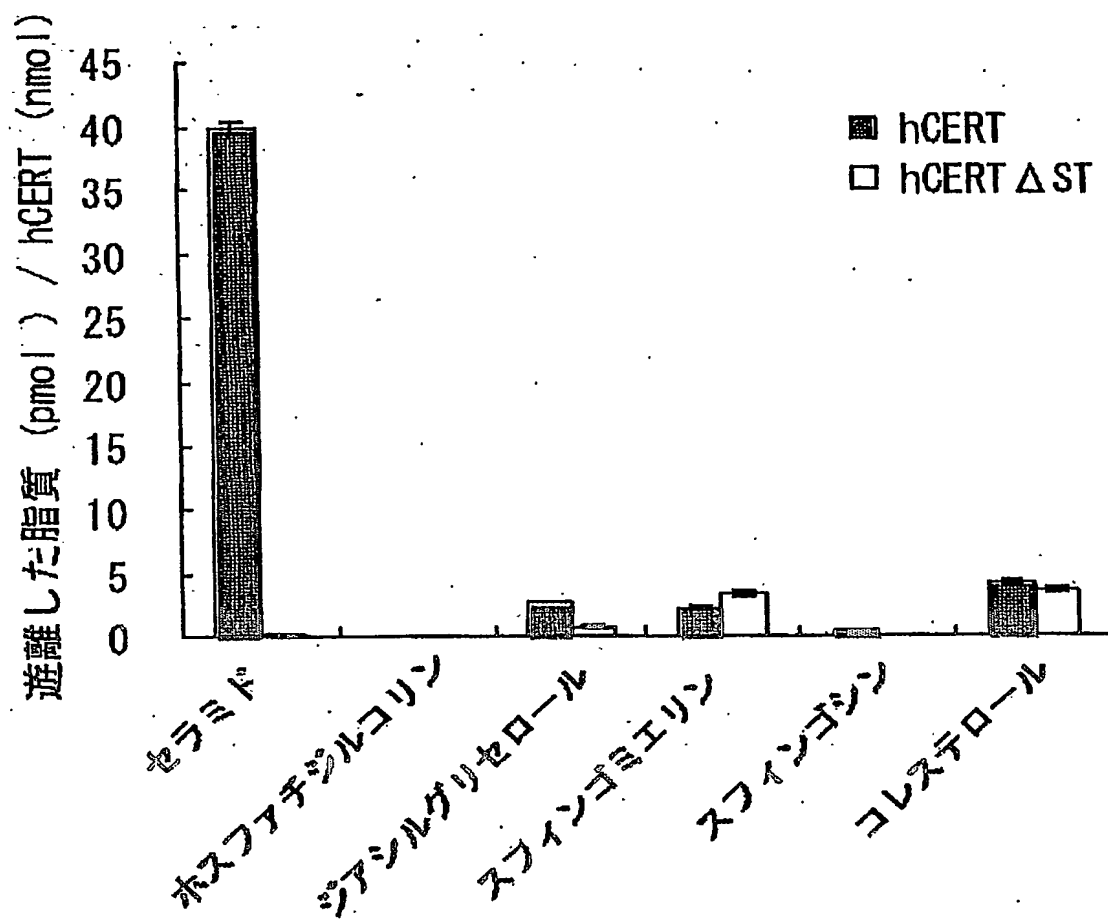
A



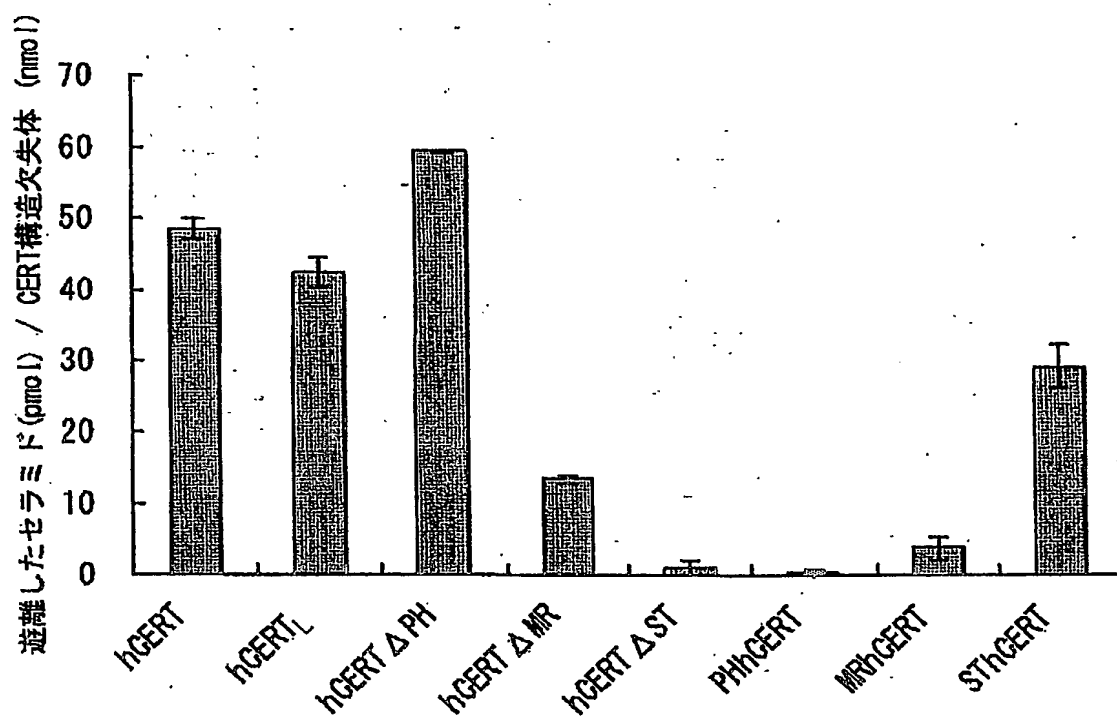
B



第 15 図

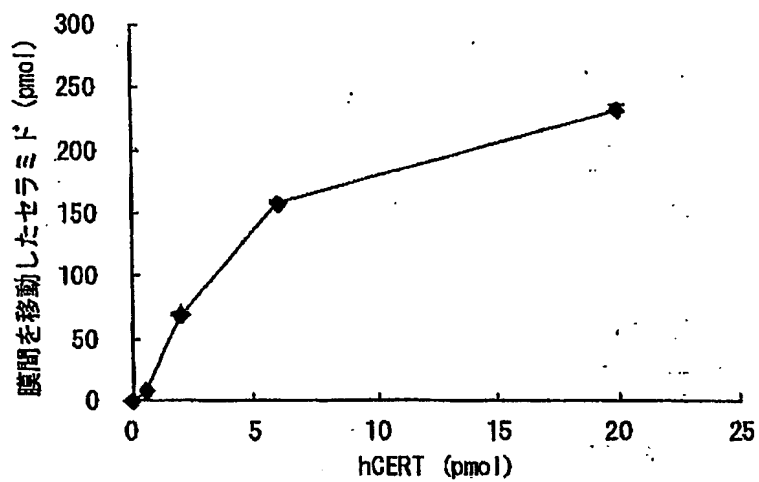


第16図

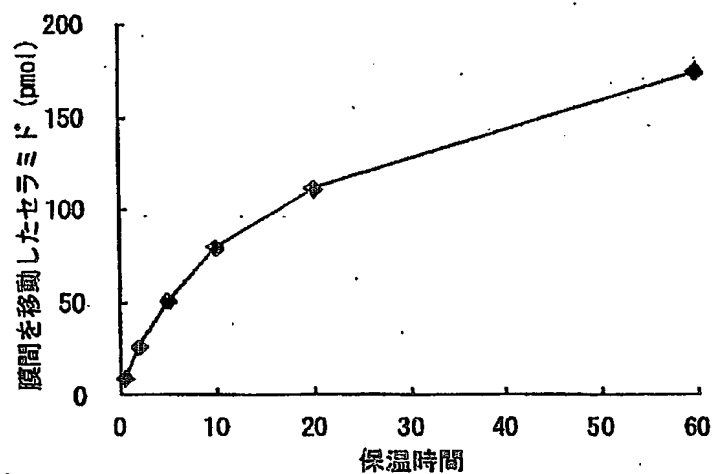


第Ⅱ図

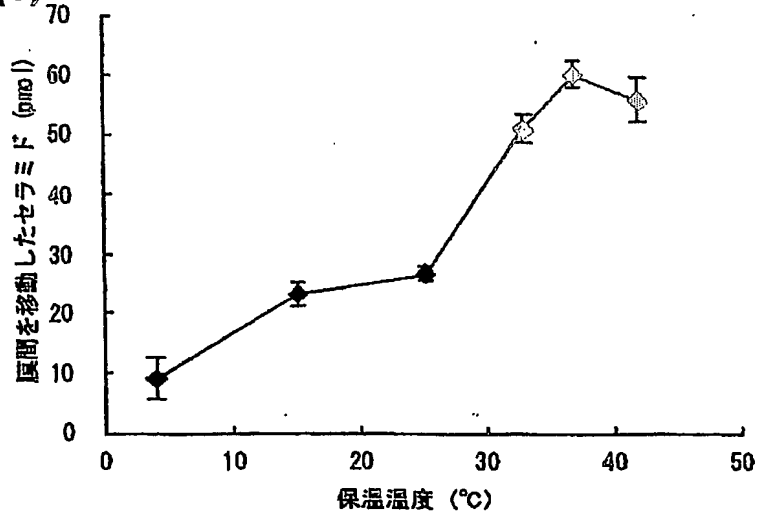
(A)



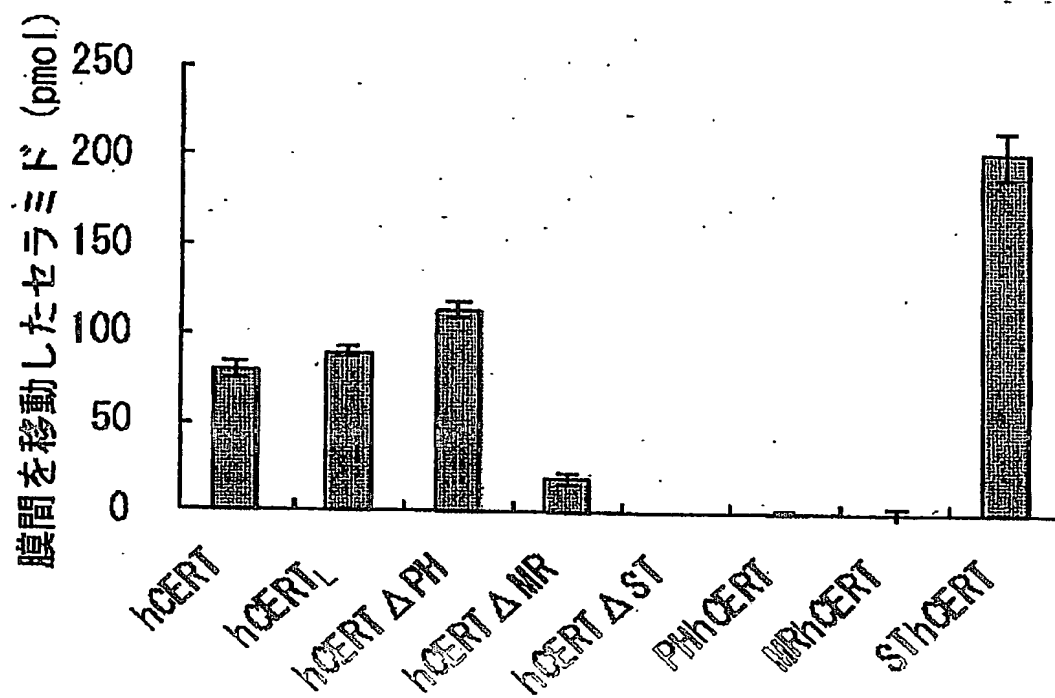
(B)



(C)



第18図



SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation
manager of Natinal Insutitute of Infectious Diseases

<120> Medicine for promoting ceramide transportation, sequence for manufacturing the medicine, method for measuring the promoting activity for ceramide isolation, and method for measuring the promoting activity for ceramide migration between membranes

<130> P000

<160> 32

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 598

<212> PRT

<213> HeLa cell

<400> 1

Met Ser Asp Asn Gln Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro
1 5 10 15

Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys
20 25 30

Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Arg Trp Val Val Leu Lys
35 40 45

Asn Asn Ala Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly
50 55 60

Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp
65 70 75 80

Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr
85 90 95

Leu Arg Ala Gln Asp Pro Asp His Arg Gln Gln Trp Ile Asp Ala Ile

100

105

110

Glu Gln His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg
 115 120 125

Arg His Gly Ser Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser
 130 135 140

Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys
 145 150 155 160

Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gln Val Asp
 165 170 175

Thr Leu Gln Lys Tyr Phe Asp Ala Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp
 180 185 190

Glu Leu Gln Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro
 195 200 205

Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Ser Thr Asn Gly Asn Lys
 210 215 220

Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp
 225 230 235 240

Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu
 245 250 255

Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Asp Ser
 260 265 270

Trp Gln Lys Arg Leu Asp Lys Glu Thr Glu Lys Lys Arg Arg Thr Glu
 275 280 285

Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Thr Glu Leu Lys Lys Lys Ser His Phe

290

295

300

Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu
 305 310 315 320

Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile
 325 330 335

Glu Glu Gln Ser Gln Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Ser
 340 345 350

Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val
 355 360 365

Gln Lys Val Glu Glu Met Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln
 370 375 380

Asp Val Gly Gly Asp Ala Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu
 385 390 395 400

Met Lys Val Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp
 405 410 415

Pro Leu Lys Ala Thr His Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val
 420 425 430

Cys Asn Tyr Phe Trp Asn Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr
 435 440 445

Ile Glu Asn Phe His Val Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile
 450 455 460

Ile Tyr Gln Thr His Lys Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val
 465 470 475 480

Leu Tyr Leu Ser Val Ile Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp

485

490

495

Pro Glu Thr Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala
 500 505 510

Pro Leu Asn Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile
 515 520 525

Cys Gln Thr Leu Val Ser Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu Ile Ser Arg
 530 535 540

Asp Asn Ile Leu Cys Lys Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val Asn Pro Gly
 545 550 555 560

Gly Trp Ala Pro Ala Ser Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu Tyr
 565 570 575

Pro Lys Phe Leu Lys Arg Phe Thr Ser Tyr Val Gln Glu Lys Thr Ala
 580 585 590

Gly Lys Pro Ile Leu Phe
 595

<210> 2
 <211> 624
 <212> PRT
 <213> HeLa cell

<400> 2

Met Ser Asp Asn Gln Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro
 1 5 10 15

Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys
 20 25 30

Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Arg Trp Val Val Leu Lys
 35 40 45

Asn Asn Ala Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly
 50 55 60

Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp
 65 70 75 80

Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr
 85 90 95

Leu Arg Ala Gln Asp Pro Asp His Arg Gln Gln Trp Ile Asp Ala Ile
 100 105 110

Glu Gln His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg
 115 120 125

Arg His Gly Ser Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser
 130 135 140

Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys
 145 150 155 160

Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gln Val Asp
 165 170 175

Thr Leu Gln Lys Tyr Phe Asp Ala Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp
 180 185 190

Glu Leu Gln Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro
 195 200 205

Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Ser Thr Asn Gly Asn Lys
 210 215 220

Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp
 225 230 235 240

Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu
 245 250 255

Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Asp Ser
 260 265 270

Trp Gln Lys Arg Leu Asp Lys Glu Thr Glu Lys Lys Arg Arg Thr Glu
 275 280 285

Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Thr Glu Leu Lys Lys Lys Ser His Phe
 290 295 300

Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu
 305 310 315 320

Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile
 325 330 335

Glu Glu Gln Ser Gln Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Ser
 340 345 350

Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val
 355 360 365

Gln Lys Pro Tyr Ser Arg Ser Ser Ser Met Ser Ser Ile Asp Leu Val
 370 375 380

Ser Ala Ser Asp Asp Val His Arg Phe Ser Ser Gln Val Glu Glu Met
 385 390 395 400

Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln Asp Val Gly Gly Asp Ala
 405 410 415

Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu Met Lys Val Tyr Arg Arg
 420 425 430

Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp Pro Leu Lys Ala Thr His
 435 440 445

Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val Cys Asn Tyr Phe Trp Asn
 450 455 460

Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr Ile Glu Asn Phe His Val
 465 470 475 480

Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile Ile Tyr Gln Thr His Lys
 485 490 495

Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val Leu Tyr Leu Ser Val Ile
 500 505 510

Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp Pro Glu Thr Trp Ile Val
 515 520 525

Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala Pro Leu Asn Asn Arg Cys
 530 535 540

Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile Cys Gln Thr Leu Val Ser
 545 550 555 560

Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu Ile Ser Arg Asp Asn Ile Leu Cys Lys
 565 570 575

Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val Asn Pro Gly Gly Trp Ala Pro Ala Ser
 580 585 590

Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu Tyr Pro Lys Phe Leu Lys Arg
 595 600 605

Phe Thr Ser Tyr Val Gln Glu Lys Thr Ala Gly Lys Pro Ile Leu Phe
 610 615 620

<210> 3
 <211> 598
 <212> PRT
 <213> CHO-K1

<400> 3

Met Ser Asp Asn Gln Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro
 1 5 10 15

Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys
 20 25 30

Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Arg Trp Val Val Leu Lys
 35 40 45

Asn Asn Thr Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly
 50 55 60

Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp
 65 70 75 80

Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr
 85 90 95

Leu Arg Ala Gln Asp Pro Asp His Arg Gln Gln Trp Ile Asp Ala Ile
 100 105 110

Glu Gln His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg
 115 120 125

Arg His Gly Ser Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser
 130 135 140

Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys
 145 150 155 160

Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gln Val Asp
 165 170 175

Thr Leu Gln Lys Tyr Phe Asp Val Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp
 180 185 190

Glu Leu Gln Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro
 195 200 205

Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Asn Thr Asn Gly Asn Lys
 210 215 220

Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp
 225 230 235 240

Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu
 245 250 255

Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Glu Ser
 260 265 270

Trp Gln Lys Arg His Asp Lys Glu Met Glu Lys Arg Arg Arg Leu Glu
 275 280 285

Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Ala Glu Leu Lys Lys Lys Pro Arg Phe
 290 295 300

Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu
 305 310 315 320

Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile
 325 330 335

Glu Glu Gln Ser Gln Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Pro
 340 345 350

Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val
 355 360 365

Gln Lys Val Glu Glu Met Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln
 370 375 380

Asp Val Gly Gly Asp Ala Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu
 385 390 395 400

Met Lys Val Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp
 405 410 415

Pro Leu Lys Ala Thr His Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val
 420 425 430

Cys Asn Tyr Phe Trp Ser Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr
 435 440 445

Ile Glu Asn Phe His Val Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile
 450 455 460

Ile Tyr Gln Thr His Lys Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val
 465 470 475 480

Leu Tyr Leu Ser Ala Ile Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp
 485 490 495

Pro Glu Thr Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala
 500 505 510

Pro Leu Asn Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile
 515 520 525

Cys Gln Thr Leu Val Ser Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu Ile Ser Arg
 530 535 540

Asp Asn Ile Leu Cys Lys Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val Asn Pro Gly
 545 550 555 560

Gly Trp Ala Pro Ala Ser Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu Tyr
 565 570 575

Pro Lys Phe Leu Lys Arg Phe Thr Ser Tyr Val Gln Glu Lys Thr Ala
 580 585 590

Gly Lys Pro Ile Leu Phe
 595

<210> 4
 <211> 624
 <212> PRT
 <213> CHO-K1

<400> 4

Met Ser Asp Asn Gln Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro
 1 5 10 15

Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys
 20 25 30

Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Arg Trp Val Val Leu Lys
 35 40 45

Asn Asn Thr Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly
 50 55 60

Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp
 65 70 75 80

Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr
 85 90 95

Leu Arg Ala Gln Asp Pro Asp His Arg Gln Gln Trp Ile Asp Ala Ile
 100 105 110

Glu Gln His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg
 115 120 125

Arg His Gly Ser Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser
 130 135 140

Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys
 145 150 155 160

Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gln Val Asp
 165 170 175

Thr Leu Gln Lys Tyr Phe Asp Val Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp
 180 185 190

Glu Leu Gln Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro
 195 200 205

Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Asn Thr Asn Gly Asn Lys
 210 215 220

Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp
 225 230 235 240

Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu
 245 250 255

Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Glu Ser
 260 265 270

Trp Gln Lys Arg His Asp Lys Glu Met Glu Lys Arg Arg Arg Leu Glu
 275 280 285

Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Ala Glu Leu Lys Lys Lys Pro Arg Phe
 290 295 300

Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu
 305 310 315 320

Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile
 325 330 335

Glu Glu Gln Ser Gln Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Pro
 340 345 350

Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val
 355 360 365

Gln Lys Pro Tyr Ser Arg Ser Ser Ser Met Ser Ser Ile Asp Leu Val
 370 375 380

Ser Ala Ser Asp Asp Val His Arg Phe Ser Ser Gln Val Glu Glu Met
 385 390 395 400

Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln Asp Val Gly Gly Asp Ala
 405 410 415

Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu Met Lys Val Tyr Arg Arg
 420 425 430

Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp Pro Leu Lys Ala Thr His
 435 440 445

Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val Cys Asn Tyr Phe Trp Ser
 450 455 460

Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr Ile Glu Asn Phe His Val
 465 470 475 480

Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile Ile Tyr Gln Thr His Lys
 485 490 495

Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val Leu Tyr Leu Ser Ala Ile
 500 505 510

Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp Pro Glu Thr Trp Ile Val
 515 520 525

Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala Pro Leu Asn Asn Arg Cys
 530 535 540

Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile Cys Gln Thr Leu Val Ser
 545 550 555 560

Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu Ile Ser Arg Asp Asn Ile Leu Cys Lys
 565 570 575

Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val Asn Pro Gly Gly Trp Ala Pro Ala Ser
 580 585 590

Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu Tyr Pro Lys Phe Leu Lys Arg
 595 600 605

Phe Thr Ser Tyr Val Gln Glu Lys Thr Ala Gly Lys Pro Ile Leu Phe
 610 615 620

<210> 5
 <211> 1794
 <212> DNA
 <213> HeLa cell

<400> 5
 atgtcggata atcagagctg gaactcgtcg ggctcggagg aggatccaga gacggagtct
 60

gggccgcctg tggagcgctg cggggtcctc agtaagtgga caaactacat tcatgggtgg
 120

caggatcggtt gggtagtttt gaaaaataat gctctgagtt actacaaatc tgaagatgaa
180
acagagtatg gctgcagagg atccatctgt cttagcaagg ctgtcatcac acctcacgat
240
tttgatgaat gtcgatttga tattagtgt aatgatagtg tttggatatct tcgtgctcag
300
gatccagatc atagacagca atggatagat gccattgaac agcacaagac tgaatctgga
360
tatggatctg aatccagctt gcgtcgacat ggctcaatgg tgtccctggg gtctggagca
420
agtggctact ctgcaacatc cacctcttca ttcaagaaag gccacagttt acgtgagaag
480
ttggctgaaa tggaacatt tagagacatc ttatgtagac aagttgacac gctacagaag
540
tactttgatg cctgtgctga tgctgtctct aaggatgaac ttcaaaggga taaagtggta
600
gaagatgatg aagatgactt tcctacaacg cgttctgatg gtgacttctt gcatagtacc
660
aacggcaata aagaaaagtt atttccacat gtgacaccaa aaggaattaa tggatatagac
720
tttaaagggg aagcgataac ttttaaagca actactgctg gaatccttgc aacactttct
780
cattgtattg aactaatggt taaacgtgag gacagctggc agaagagact ggataaggaa
840
actgagaaga aaagaagaac agaggaagca tataaaaatg caatgacaga acttaagaaa
900
aaatcccact ttggaggacc agattatgaa gaaggcccta acagtctgat taatgaagaa
960
gagttctttg atgctgttga agctgctctt gacagacaag ataaaataga agaacagtca
1020
cagagtgaaa aggtgagatt acattggcct acatccttgc cctctggaga tgccttttct
1080

tctgtgggga cacatagatt tgtccaaaag gttgaagaga tgggtgcagaa ccacatgact
1140

tactcattac aggatgtagg cggagatgcc aattggcagt tggttgtaga agaaggagaa
1200

atgaaggat acagaagaga agtagaagaa aatgggattg ttctggatcc tttaaaagct
1260

acccatgcag ttaaaggcgt cacaggacat gaagtctgca attatttctg gaatgttgac
1320

gttcgcaatg actgggaaac aactatagaa aactttcatg tggtggaac attagctgat
1380

aatgcaatca tcatttatca aacacacaag aggggtgtggc ctgcttctca gcgagacgta
1440

ttatatcttt ctgtcattcg aaagatacca gccttgactg aaaatgacce tgaaacttgg
1500

atagtttgta atttttctgt ggatcatgac agtgctcctc taaacaaccg atgtgtccgt
1560

gccaaaataa atgttgctat gatttgtcaa accttggtaa gccaccaga gggaaaccag
1620

gaaattagca gggacaacat tctatgcaag attacatatg tagctaattg gaaccctgga
1680

ggatgggcac cagcctcagt gttaaggga gtggcaaagc gagagtatcc taaatttcta
1740

aaacgtttta cttcttacgt ccaagaaaaa actgcaggaa agcctatttt gttc
1794

<210> 6
<211> 1872
<212> DNA
<213> HeLa cell

<400> 6
atgtcggata atcagagctg gaactcgtcg ggctcggagg aggatccaga gacggagtct
60

gggccgcctg tggagcgtg cggggtcctc agtaagtga caaactacat tcatgggtgg
120

caggatcggtt gggtagtttt gaaaaataat gctctgagtt actacaaatc tgaagatgaa
180
acagagtatg gctgcagagg atccatctgt cttagcaagg ctgtcatcac acctcacgat
240
tttgatgaat gtcgatttga tattagtgt aatgatagtg ttiggtatct tcgtgctcag
300
gatccagatc atagacagca atggatagat gccattgaac agcacaagac tgaatctgga
360
tatggatctg aatccagctt gcgtcgacat ggctcaatgg tgtccctggg gtctggagca
420
agtggctact ctgcaacatc cacctcttca ttcaagaaag gccacagttt acgtgagaag
480
ttggctgaaa tggaacatt tagagacatc ttatgtagac aagttgacac gctacagaag
540
tactttgatg cctgtgctga tgctgtctct aaggatgaac ttcaaaggga taaagtggta
600
gaagatgatg aagatgactt tcctacaacg cgttctgatg gtgacttctt gcatagtacc
660
aacggcaata aagaaaagtt atttccacat gtgacaccaa aaggaattaa tggatatagac
720
tttaaagggg aagcgataac ttttaaagca actactgctg gaatccttgc aacactttct
780
cattgtattg aactaatggt taaacgtgag gacagctggc agaagagact ggataaggaa
840
actgagaaga aaagaagaac agaggaagca tataaaaatg caatgacaga acttaagaaa
900
aaatcccact ttggaggacc agattatgaa gaaggcccta acagtctgat taatgaagaa
960
gagttctttg atgctgttga agctgctctt gacagacaag ataaaataga agaacagtca
1020
cagagtgaag aggtgagatt acattggcct acatccttgc cctctggaga tgccttttct
1080

tctgtgggga cacatagatt tgtccaaaag ccctatagtc gctcttcctc catgtcttcc
1140

attgatctag tcagtgcctc tgatgatgtt cacagattca gctcccaggt tgaagagatg
1200

gtgcagaacc acatgactta ctcattacag gatgtaggcg gagatgccaa ttggcagttg
1260

gttgtagaag aaggagaaat gaaggtatac agaagagaag tagaagaaaa tgggattgtt
1320

ctggatcctt taaaagctac ccatgcagtt aaaggcgtca caggacatga agtctgcaat
1380

tatttctgga atgttgacgt tcgcaatgac tgggaaacaa ctatagaaaa ctttcatgtg
1440

gtggaaacat tagctgataa tgcaatcatc atttatcaaa cacacaagag ggtgtggcct
1500

gcttctcagc gagacgtatt atatctttct gtcattcgaa agataccagc cttgactgaa
1560

aatgaccctg aaacttgat agtttgtaat ttttctgtgg atcatgacag tgctcctcta
1620

aacaaccgat gtgtccgtgc caaaataaat gttgctatga tttgtcaaac cttggtgaagc
1680

ccaccagagg gaaaccagga aattagcagg gacaacattc tatgcaagat tacatatgta
1740

gctaattgtga accctggagg atgggcacca gcctcagtgt taagggcagt ggcaaagcga
1800

gagtatccta aatttctaaa acgttttact tcttacgtcc aagaaaaaac tgcaggaaag
1860

cctattttgt tc
1872

<210> 7
<211> 2473
<212> DNA
<213> CHO-K1

<400> 7

acgcggggag tgggcccggc aggaagatgg cggcggtagc ggaggtgtga gcggacctgg
60gtctctgccg ctggcttggc tcttcctgtc ttctcccct cctccctccc cgactgaggt
120tggcaccag ggggccgagt tcaggtggcg gcgccgggag cagcgcaggg gtcacggcca
180cgccacggc ggctgacggc tggaaggga ggctttcttc gccgctcgtc ctccttccca
240ggtcgctcg gtgtcaggcg cggcgacggc ggcgcagcgg gcgcgcttcc tccctcttcc
300tgttccctca cgccccggag cgggcactct tggctgtgcc atccccgac ccttcacccc
360agggactggg cgcctgcact ggcgcagctc tcggagcggg ggccggtctc ctgctcgcct
420gtcgcgcctc catgtcggat aaccagagct ggaactcgtc gggctcggag gaggatccgg
480agacggagtc cgggccgcct gtggagcgct gcggggtcct cagcaagtgg acaaactata
540ttcatgggtg gcaggatcgt tgggtagttt tgaaaaataa tactttgagt tactacaaat
600ctgaagatga gacagagtac ggttgcaggg gatccatctg tcttagcaag gctgtgatca
660cacctcatga ttttgatgaa tgtcggtttg atatcagtgt taatgatagt gtttggtatc
720ttcgtgctca ggaccagat cacagacagc agtggataga tgccattgaa cagcacaaga
780ctgaatcagg atatggatct gaggccagct tacgtagaca tggctcaatg gtgtcactgg
840tgtctggagc aagtgggtac tctgctacat ccacatcttc attcaagaaa ggacacagtt
900

tacgtgagaa attggctgaa atggaaactt ttagagacat cttatgtaga caagttgaca

960

ctctccaaaa gtactttgat gtctgtgctg atgctgtctc caaggatgaa cttcaaaggg
1020

ataaagtggg agaagatgat gaagatgact tccctacaac tcgttctgat ggagactttt
1080

tgcacaatac caatggtaat aaggaaaaat tatttccaca tgtaaccccc aaaggaatta
1140

atggtataga ctttaaaggg gaagcaataa cttttaaagc aactactgct ggaatccttg
1200

ctacactttc tcattgtatt gaattaatgg taaaacggga agagagctgg caaaaaagac
1260

atgataagga aatggagaag agaagacgat tagaggaagc atacaagaat gcaatggcag
1320

agcttaagaa gaaaccccggt tttggagggc ctgattatga agaaggtccg aacagtctga
1380

ttaatgagga ggagttcttt gatgctgttg aagctgctct tgacagacaa gataaaatag
1440

aggaacagtc acagagcgag aaggtcaggt tacactggcc tacacctttg ccatctggag
1500

atgccttttc ttctgttggg acccatagat ttgtacaaaa ggttgaagag atggtacaga
1560

accacatgac ttactcatta caggatgtag gtggtgatgc gaattggcaa ctagttgtag
1620

aagaaggaga aatgaaggta tacagaagag aagtcgaaga aaatggaatt gttctggatc
1680

ctttgaaagc tacccatgca gttaaagggtg ttacaggaca cgaagtctgc aattactttt
1740

ggagtgttga tgttcgcaat gactgggaaa ctactataga aaacttccat gtagtgga
1800

cattagctga taatgcaatc atcatttata aaacgcacaa gagagtgtgg cctgcttctc
1860

agagagatgt actgtatctt tctgctatcc gaaagatccc agccttgact gagaacgacc

1920

ctgagacttg gatagtttgt aatttttctg tggatcatga cagcgctcct ctgaacaatc
1980

gatgtgtccg tgccaaaatc aatgttgcta tgatttgtca aaccttagta agcccaccag
2040

agggaacca ggaaataagc agagacaaca ttctgtgcaa gattacatat gtagctaattg
2100

tgaaccagg aggatgggca ccagcctcgg tgtaagagc agtggcaaaa cgagaatatc
2160

ctaaatttct aaaacgtttt acttcttacg tccaagaaaa aactgcagga aaaccaattt
2220

tgtttttagta tgtacagtga ctgaagcaag gctgtgtgac attccatggt ggagaaagaa
2280

agaagaaaaa ttgagttctc taagctggaa cataggatct acagccttgt ccatggccca
2340

agaagaatca ttgcaatagt aaagctgggt atctaact agccatctcc tgatagatct
2400

ccttgctcaa tgtgtaacta taaatacatg taaaatcaca tgcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
2460

aaaaaaaaaa aaa
2473

<210> 8
<211> 1872
<212> DNA
<213> CHO-K1

<400> 8
atgtcggata accagagctg gaactcgtcg ggctcggagg aggatccgga gacggagtcc
60

gggccgcctg tggagcgctg cggggtcctc agcaagtgga caaactatat tcatgggtgg
120

caggatcggt gggtagtttt gaaaaataat actttgagtt actacaaatc tgaagatgag
180

acagagtacg gttgcagggg atccatctgt cttagcaagg ctgtgatcac acctcatgat
240

tttgatgaat gtcggtttga tatcagtgtt aatgatagtg tttggtatct tcgtgctcag
300

gaccagatc acagacagca gtggatagat gccattgaac agcacaagac tgaatcagga
360

tatggatctg agtccagctt acgtagacat ggctcaatgg tgtcactggt gtctggagca
420

agtgggtact ctgctacatc cacatcttca ttcaagaaag gacacagttt acgtgagaaa
480

ttggctgaaa tggaaacttt tagagacatc ttatgtagac aagttgacac tctccaaaag
540

tactttgatg tctgtgctga tgctgtctcc aaggatgaac ttcaaaggga taaagtggta
600

gaagatgatg aagatgactt ccctacaact cgttctgatg gagacttttt gcacaatacc
660

aatggtaata aggaaaaatt atttccacat gtaaccccca aaggaattaa tggatatagac
720

tttaaagggg aagcaataac ttttaaagca actactgctg gaatccttgc tacactttct
780

cattgtattg aattaatggt aaaacgggaa gagagctggc aaaaaagaca tgataaggaa
840

atggagaaga gaagacgatt agaggaagca tacaagaatg caatggcaga gcttaagaag
900

aaaccccggt ttggagggcc tgattatgaa gaaggtccga acagtctgat taatgaggag
960

gagttctttg atgctgttga agctgctctt gacagacaag ataaaataga ggaacagtca
1020

cagagcgaga aggtcaggtt acactggcct acacctttgc catctggaga tgccttttct
1080

tctgttggga cccatagatt tgtacaaaag ccctatagtc gctcttcctc catgtcttcc
1140

attgatctag tcagtgcctc tgacgatgtt cacagattca gctcccaggt tgaagagatg
1200

gtacagaacc acatgactta ctcattacag gatgtaggtg gtgatgcgaa ttggcaacta
1260

gttgtagaag aaggagaaat gaaggtatac agaagagaag tcgaagaaaa tggaattgtt
1320

ctggatcctt tgaaagctac ccatgcagtt aaaggtgtta caggacacga agtctgcaat
1380

tacttttggg gtgttgatgt tcgcaatgac tgggaaacta ctatagaaaa cttccatgta
1440

gtggaaacat tagctgataa tgcaatcatc atttatcaaa cgcacaagag agtgtggcct
1500

gcttctcaga gagatgtact gtatctttct gctattcgaa agatcccagc cttgactgag
1560

aacgaccctg agacttggat agtttgtaat ttttctgtgg atcatgacag cgctcctctg
1620

aacaatcgat gtgtccgtgc caaaatcaat gttgctatga tttgtcaaac cttagtaagc
1680

ccaccagagg gaaaccagga aataagcaga gacaacattc tgtgcaagat tacatatgta
1740

gctaattgtga acccaggagg atgggcacca gcctcgggtg taagagcagt ggcaaaacga
1800

gaatatccta aatttctaaa acgttttact tcttacgtcc aagaaaaaac tgcaggaaaa
1860

ccaattttgt tt
1872

<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 9
gccctcactc cttctctagg cg
22

<210> 10
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 10
cttaagctag cttgccaaac ctacagg
27

<210> 11
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 11
cagaattcac catgtcggat aatcagagct gg
32

<210> 12
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 12
cagaattcac catggactac aaggacgacg acaaaatgtc ggataatcag agctgg
56

<210> 13
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 13

ggctcgagct agaacaaaat aggctttcct gc
32

<210> 14

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 14

ggctcgagct atttgtcgtc gtcctttag taggaacaaa taggctttcc tgc
53

<210> 15

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 15

cagaggcact gactagatca atggaagaca tggaggaaga gcgactatag ggcttttggg
60

caaattctatg tgtcc

75

<210> 16

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 16

ccattgatct agtcagtgcc tctgatgatg ttcacagatt cagctcccag gttgaagaga

60

tggtgcagaa cc
72

<210> 17
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 17
cagaattcac catggaatct ggatatggat ctgaatc
37

<210> 18
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 18
ggctcgagct attggacaaa tctatgtgtc cc
32

<210> 19
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 19
ctcttcaacc ttagtcttgt gctgttcaat ggc
33

<210> 20
<211> 33
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 20

cagcacaaga ctaaggttga agagatggtg cag
33

<210> 21

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 21

cacaagcttc ggataatcag agctggaac
29

<210> 22

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 22

ggctcgagct aagatctagt cttgtgctgt tcaatggc
38

<210> 23

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 23

cacaagcttc ggaatctgga tatggatctg aatcc
35

<210> 24
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 24
ggctcgagct aagatctttg gacaaatcta tgtgtccc
38

<210> 25
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 25
cacaagcttc gaaggttgaa gagatggtgc ag
32

<210> 26
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 26
ggctcgagct aagatctgaa caaaataggc tttcctgc
38

<210> 27
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 27
gagaaagtgt agcaaggatt ccagcagtag ttgc
34

<210> 28
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 28
gaagatgact tccctacaac tcgttctgat gg
32

<210> 29
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 29
tagaattcac tggcgcagct ctcg
24

<210> 30
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 30
ggctcgagga atgtcacaca gccttgc
27

<210> 31
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 31

aagatcccag ccttgactg
19

<210> 32

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 32

ggctcgagga acaaaatagg ctttcctgc
29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004455

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/17, 47/24, A61P35/00, 37/04, 31/00, 43/00, C12N15/12, C07K14/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/17, 47/24, C12N15/12, C07K14/47

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 00/50607 A2 (SAUS, Juan), 31 August, 2000 (31.08.00), Claims; pages 19 to 20; examples (Family: none)	1, 2, 4-6 3, 7-15
X A	RAYA, A. et al., "Characterization of a novel type of serine/threonine kinase that specifically phosphorylates the human goodpasture antigen.", J.Biol.Chem., 1999, Vol.274, No.18, pages 12642 to 12649	1, 2, 4-6 3, 7-15
X A	RAYA, A. et al., "Goodpasture antigen-binding protein, the kinase that phosphorylate the goodpasture antigen, is an alternatively spliced variant implicated in autoimmune pathogenesis.", J.Biol.Chem., 2000, Vol.275, No.51, pages 40392 to 40399	1, 2, 4-6 3, 7-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 June, 2004 (29.06.04)Date of mailing of the international search report
13 July, 2004 (13.07.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004455

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

According to claim 1, the present invention relates to a drug promoting ceramide transport which contains CRET protein as the active ingredient and the above protein had been publicly known as stated in the background art of the description. Thus, it is recognized that "the special technical feature" of the present invention resides in specific use of the above protein *per se*.

However, the inventions according to claims 5 and 6 relate not to the use of the above protein but to DNA encoding the above protein *per se*. Accordingly, it cannot be considered that there is "a special technical feature" among these groups of inventions. (Continued to extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004455

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

Such being the case, it is obvious that the inventions according to claims 1 to 4 and 7 to 15 and the inventions according to claims 5 and 6 do not comply with the requirement of unity of invention.

Even though the statement in the description is discussed, it is unclear what drugs, in addition to the protein as set forth in claim 1, are involved in the scope of the term "a drug promoting ceramide release" as described in claims 7 to 15 and what are not, which makes the scope of the present invention unclear.

Thus, claims 7 to 15 and the description do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out.

Such being the case, prior art documents were searched for in this international search report concerning the drugs specifically presented in the description.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/17, 47/24, A61P35/00, 37/04, 31/00, 43/00, C12N15/12, C07K14/47

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/17, 47/24, C12N15/12, C07K14/47

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 00/50607 A2 (SAUS, Juan) 2000. 08. 31, Claims, p.19-20, EXAMPLES (ファミリーなし)	1, 2, 4-6 3, 7-15
X A	RAYA, A. et al, Characterization of a novel type of serine/threonine kinase that specifically phosphorylates the human goodpasture antigen., J. Biol. Chem., 1999, Vol.274, No.18, pp.12642-12649	1, 2, 4-6 3, 7-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.06.2004

国際調査報告の発送日

13.7.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

川口 裕美子

4C

3127

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	RAYA, A. et al, Goodpasture antigen-binding protein, the kinase that phosphorylates the goodpasture antigen, is an alternatively spliced variant implicated in autoimmune pathogenesis., J. Biol. Chem., 2000, Vol.275, No.51, pp.40392-40399	1, 2, 4-6 3, 7-15

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1の記載によれば、本願に係る発明はCRETタンパク質を有効成分として含有するセラミド輸送を促進する薬剤に関するものであって、前記タンパク質は明細書の背景技術にもあるように公知のものであるから、本願発明の「特別な技術的特徴」とは、前記タンパク質の具体的な用途それ自体にあるものと認められる。

しかし、請求の範囲5及び6に係る発明は前記タンパク質をコードしたDNAそのものであって、前記タンパク質の用途ではないのであるから、両発明の間に共通する「特別な技術的特徴」があるとは言えない。

よって、請求の範囲1-4、7-15に係る発明と請求の範囲5及び6に係る発明とは、発明の単一性の要件を満たしていないことが明らかである。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲 7-15 に記載された「セラミド遊離を促進する薬剤」なる文言は、明細書の記載を検討しても、請求の範囲 1 に記載のタンパク質以外に、具体的にいかなる薬剤を包含し、また、包含しないかが明確であるとはいえないから、本願発明の範囲を不明確にするものである。

したがって、請求の範囲 7-15 及び明細書は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない。

そこで、この国際調査報告では明細書に具体的に記載された薬剤に基づいて先行技術文献調査を行った。